

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDA MACIEL BUSATO

SEXAGEM FETAL EM EQUINOS: TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS POR ACESSO  
RETAL E PREDIÇÃO BASEADA NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE  
TESTOSTERONA MATERNA

CURITIBA

2018

EDUARDA MACIEL BUSATO

SEXAGEM FETAL EM EQUINOS: TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS POR ACESSO  
RETAL E PREDIÇÃO BASEADA NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE  
TESTOSTERONA MATERNA

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre no curso de  
Pós-Graduação em Engenharia de  
Bioprocessos e Biotecnologia, área de  
concentração: Saúde Animal e Humana, Setor  
de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Tomaz Soccol

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

B976s

Busato, Eduarda Maciel

Sexagem fetal em equinos: técnicas ultrassonográficas por acesso retal e predição baseada nas concentrações plasmáticas de testosterona materna / Eduarda Maciel Busato. – Curitiba, 2018.

75 p. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Romildo Romualdo Weiss – Coorientador: Vanete Tomaz Soccol.

Bibliografia: p. 70-74.

1. Ultrassonografia veterinária. 2. Cavalos. 3. Reprodução animal. 4. Equinos – Gestação. I. Universidade Federal do Paraná. II. Weiss, Romildo Romualdo. III. Soccol, Vanete Tomaz. IV. Título.

CDD: 636.089607543

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EDUARDA MACIEL BUSATO** intitulada: "**Sexagem fetal em equinos: técnicas ultrassonográficas por acesso retal e predição baseada nas concentrações plasmáticas de testosterona materna**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 19 de Abril de 2018.

ROMILDO ROMUALDO WEISS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TÁCIA GOMES BERGSTEIN GALAN  
Avaliador Externo (UFPR)

LUIZ ERNANDES KOZICKI  
Avaliador Externo (PUC/PR)

**Dedico este trabalho aos meus avós, Calmo e Orlene,  
as melhores pessoas que conheci e que  
hoje são meus anjos da guarda.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus avós, Calmo e Orlene, por serem os grandes responsáveis pela pessoa que sou hoje. Vocês foram meus maiores exemplos de vida, amor e bondade e sempre serão os pilares da nossa família e educação.

A toda minha família pelo apoio durante o período do mestrado e por estarem sempre presentes. Especialmente à minha mãe, Ana Lucia, por me ensinar a amar os animais e sempre me apoiar na profissão. Às minhas irmãs, Rebeca e Juliana, por serem minhas melhores amigas e meu porto seguro, amo vocês.

Ao meu noivo, Nathanael, que mesmo morando há 1000 km de distância sempre esteve presente em todos os momentos de dificuldade e de alegria. Obrigada por acreditar na minha capacidade mais que eu mesma, amo você.

Aos meus amigos, que acompanharam minha trajetória e torceram por mim. Obrigada por tornarem os momentos mais leves e por celebrarem comigo cada conquista.

À Ana Claudia, uma amiga que o mestrado me deu, por toda a ajuda, estudo e parceria durante estes dois anos. Juntas nós pudemos aprender muito mais do que sozinhas.

Ao professor Dr. Romildo Romualdo Weiss, pela orientação durante este trabalho e por acreditar no meu potencial. Obrigada pela oportunidade de desenvolver um projeto de mestrado e por compartilhar seus conhecimentos.

A toda equipe do Rancho JB, especialmente ao Sr. Otto Jayme Beckert, por confiar em nós e permitir que trabalhássemos com seus animais, e ao médico veterinário Felipe Augusto Beckert Marcondes, por todo o auxílio durante a execução do experimento.

Aos professores Dr. Peterson Triches Dornbusch e Dr. Juan Carlos Duque Moreno e à mestranda Eloisa Muehlbauer, por me auxiliarem na realização da análise estatística deste trabalho.

À professora Dra. Eunice Oba e à equipe do Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal da Unesp-Botucatu, por me auxiliarem na realização das dosagens de testosterona.

Aos membros da banca, professor Dr. Luiz Ernandes Kozicki e Dra. Tácia Gomes Bergstein-Galan, por dedicarem seu tempo para avaliação e aprimoramento desta dissertação.

Aos alunos da graduação, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado durante as aulas que ministrei nas disciplinas de fisiopatologia da reprodução e biotecnologia da reprodução.

Ao curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e auxílio fornecidos durante o desenvolvimento desse trabalho, e à professora Dra. Vanete Soccol pela co-orientação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, aos animais, que representam a base de todo meu trabalho e minha formação profissional. Obrigada por me ensinarem tanto, mesmo sem dizer uma única palavra. Sempre seguirei meu caminho mantendo todo o amor e respeito que vocês merecem.

***“Do mesmo modo que o campo, por mais fértil que seja,  
sem cultivo não pode dar frutos, assim é o espírito sem estudo”***

Cícero



## RESUMO

A sexagem fetal é uma biotecnologia subutilizada na equideocultura, no entanto o interesse por esta técnica tem se mostrado crescente. Os métodos atualmente descritos para o diagnóstico do sexo fetal incluem duas abordagens por ultrassonografia transretal, uma por ultrassonografia transabdominal e uma pela detecção de DNA fetal livre circulante no sangue materno. Os objetivos do presente estudo foram: comparar duas técnicas de ultrassonografia transretal para a sexagem fetal em equinos; e avaliar a influência do sexo fetal sobre as concentrações plasmáticas de testosterona materna em éguas gestantes. Esse trabalho foi dividido em três capítulos, sendo o primeiro composto por uma revisão de literatura sobre sexagem fetal em equinos; o segundo acerca do experimento realizado em éguas da raça Crioula para comparação da eficiência entre duas técnicas de determinação ultrassonográfica do sexo fetal a campo (experimento 1); e o terceiro aborda o experimento realizado para avaliação da influência do sexo fetal sobre as concentrações de testosterona plasmática em éguas, entre o 5º e o 8º mês de gestação (experimento 2). No experimento 1 foram utilizadas 27 éguas, as quais foram submetidas à sexagem fetal pela identificação do tubérculo genital e à sexagem baseada na avaliação das gônadas fetais. Foi realizada uma única avaliação por técnica em cada animal e o sexo dos potros foi confirmado ao nascimento. A sexagem pela identificação do tubérculo genital ocorreu entre 59 e 65 dias de gestação, resultando em uma taxa de diagnósticos possíveis de 51,9% (14/27) e acurácia de 85,7% (12/14). A sexagem baseada na avaliação das gônadas fetais foi realizada entre 117 e 126 dias de gestação, sendo a taxa de diagnósticos possíveis 88,9% (24/27) e a acurácia 83,3% (20/24). A acurácia de ambas as técnicas não apresentou diferença estatística ( $P>0,05$ ), no entanto a taxa de diagnósticos possíveis foi superior pela técnica baseada nas gônadas fetais ( $P<0,05$ ). Conclui-se que, em condições de campo, a sexagem fetal pela avaliação das gônadas fetais apresentou melhor eficácia, tendo como principal vantagem a maior taxa de diagnósticos possíveis. O experimento 2 foi realizado em 21 éguas. Amostras de sangue foram coletadas, com intervalos de 30 dias, a partir de 150 dias de gestação até 240 dias. A testosterona plasmática foi determinada por radioimunoensaio e o sexo dos potros foi confirmado ao nascimento. Os valores de testosterona materna foram superiores nas éguas gestando fetos fêmeas aos 5 e 8 meses ( $P<0,05$ ). Foram determinados valores limites para diferenciação dos sexos, sendo 35,5pg/mL para o 5º mês e 40pg/mL para o 8º. Éguas com testosterona plasmática igual ou acima dos valores limites foram preditas como gestando fêmeas e éguas com testosterona plasmática abaixo dos valores limites foram preditas como gestando machos. Aos 5 meses, os valores preditivos para fetos machos e fêmeas foram 70% e 88,9%, respectivamente; as taxas de detecção foram 87,5% e 72,7% e a acurácia total do exame foi de 78,9%. Aos 8 meses, os valores preditivos para fetos machos e fêmeas foram 80% e 90%, respectivamente; as taxas de detecção foram 88,9% e 81,8% e a acurácia total do exame foi de 85%. Conclui-se que o sexo fetal influenciou as concentrações plasmáticas de testosterona em éguas gestantes. A predição do sexo fetal baseada nas concentrações plasmáticas de testosterona materna pode ser realizada aos 5 e 8 meses de gestação com 78,9% e 85% de acurácia, respectivamente.

**Palavras chave:** cavalos; reprodução; gestação; ultrassonografia.

## ABSTRACT

Fetal sexing is an underutilized biotechnology in equideoculture, however the interest in this technique has been increasing. The methods currently described for fetal sex diagnosis include two transrectal ultrasound approaches, one transabdominal ultrasonography, and one for the detection of free fetal DNA circulating in maternal blood. The objectives of the present study were: to compare two techniques of transrectal ultrasonography for fetal sexing in horses; and evaluate the influence of fetal sex on maternal testosterone plasma concentrations in pregnant mares. This work was divided into three chapters, the first being a literature review of fetal sexing in horses; the second one about the experiment conducted in Crioulo mares to compare the efficiency between two techniques of ultrasonographic determination of fetal sex under field conditions (experiment 1); and the third one deals with the experiment performed to evaluate the influence of fetal sex on plasma testosterone concentrations in mares between the 5th and 8th month of gestation (experiment 2). In the experiment 1, 27 mares were used, which were submitted to fetal sexing for identification of the genital tubercle and sexing based on the evaluation of the fetal gonads. A single technique evaluation was performed on each animal and the sex of the foals was confirmed at birth. The sexing by the identification of the genital tubercle occurred between 59 and 65 days of gestation, resulting in a possible diagnosis rate of 51.9% (14/27) and accuracy of 85.7% (12/14). The sexing based on the evaluation of fetal gonads was performed between 117 and 126 days of gestation, with the possible diagnosis rate being 88.9% (24/27) and the accuracy 83.3% (20/24). The accuracy of both techniques did not present statistical difference ( $P>0,05$ ), however, the possible diagnosis rate was higher by the technique based on the fetal gonads ( $P<0,05$ ). It was concluded that, under field conditions, fetal sexing through the evaluation of fetal gonads presented better efficacy, with the main advantage being the higher rate of possible diagnoses. Experiment 2 was performed on 21 mares. Blood samples were collected at intervals of 30 days, from 150 days of gestation up to 240 days. Plasma testosterone was determined by radioimmunoassay and the sex of the foals was confirmed at birth. The values of maternal testosterone were higher in the mares gestating female fetuses at 5 and 8 months ( $P<0.05$ ). Limit values for sex differentiation were determined, with 35.5pg / mL for the 5th month and 40pg / mL for the 8th month. Mares with plasma testosterone equal to or above limit values were predicted as gestating females and mares with plasma testosterone below the limit values were predicted as male gestating. At 5 months, the predictive values for male and female fetuses were 70% and 88.9%, respectively; the detection rates were 87.5% and 72.7%, and the total accuracy of the examination was 78.9%. At 8 months, the predictive values for male and female fetuses were 80% and 90%, respectively; the detection rates were 88.9% and 81.8%, and the total accuracy of the examination was 85%. It was concluded that fetal sex influenced the plasma concentrations of testosterone in pregnant mares. Prediction of fetal sex based on plasma concentrations of maternal testosterone can be performed at 5 and 8 months gestation with 78.9% and 85% accuracy, respectively.

**Key words:** horses; reproduction; gestation; ultrasonography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1** – Imagens ultrassonográficas obtidas durante a sexagem fetal pela técnica da identificação do tubérculo genital.....**22**
- FIGURA 2** – Imagens ultrassonográficas obtidas durante a realização da sexagem fetal pela avaliação das gônadas fetais .....**27**

### CAPÍTULO II

- FIGURA 1** – Imagens ultrassonográficas de fetos equinos aos 60 dias de gestação .....**37**
- FIGURA 2** – Imagens ultrassonográficas de feto equino aos 120 dias de gestação.. .....**37**
- FIGURA 3** – Imagens ultrassonográficas das gônadas fetais de equinos aos 120 dias de gestação .....**38**

### CAPÍTULO III

- FIGURA 1** – Equações utilizadas nos cálculos dos valores preditivos, taxas de detecção e acurácia para a predição do sexo fetal em éguas, com base nas concentrações maternas de testosterona plasmática.....**52**
- FIGURA 2** – Níveis médios de testosterona plasmática em éguas gestando fetos do sexo feminino (F) ou masculino (M) entre o 5º e o 8º mês de gestação .....**54**
- FIGURA 3** – Níveis médios de testosterona plasmática em éguas gestando fetos do sexo masculino (M) entre o 5º e o 8º mês de gestação .....**54**
- FIGURA 4** – Curvas ROC (receiver operating characteristic) para a determinação dos valores limites para testosterona plasmática aos 5 e 8 meses de gestação na égua.....**55**

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO I**

<b>TABELA 1</b> – Resultados de sexagem fetal em equinos pela identificação e posição do tubérculo genital, obtidos em diferentes estudos .....	<b>24</b>
---	-----------

### **CAPÍTULO II**

<b>TABELA 1</b> – Resultados da sexagem fetal realizada pela identificação do tubérculo genital e pela diferenciação das gônadas fetais em éguas da raça Crioula. ....	<b>39</b>
<b>TABELA 2</b> – Resultados da sexagem fetal realizada pela identificação do tubérculo genital e pela diferenciação das gônadas fetais em éguas da raça Crioula, de acordo com o sexo do feto. ....	<b>41</b>

### **CAPÍTULO III**

<b>TABELA 1</b> – Valores de testosterona plasmática em éguas gestantes, do 5° o 8° mês de gestação, de acordo com o sexo do feto. ....	<b>53</b>
<b>TABELA 2</b> – Cálculos dos valores preditivos, taxas de detecção e acurácia para a predição do sexo fetal de acordo com a concentração materna de testosterona em éguas, aos 5 meses de gestação .....	<b>55</b>
<b>TABELA 3</b> – Cálculos dos valores preditivos, taxas de detecção e acurácia para a predição do sexo fetal de acordo com a concentração materna de testosterona em éguas, aos 8 meses de gestação .....	<b>56</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos gerais .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I – SEXAGEM FETAL EM EQUINOS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Desenvolvimento.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Sexagem Fetal pela identificação do tubérculo genital .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Sexagem Fetal pela identificação das gônadas fetais e genitália externa .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Sexagem Fetal pela detecção de DNA fetal livre circulante .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Referências.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II – SEXAGEM FETAL VIA TUBÉRCULO GENITAL VERSUS AVALIAÇÃO DAS GÔNADAS FETAIS, DETERMINADAS POR ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOLA EM CONDIÇÕES DE CAMPO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>Referências.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III – INFLUÊNCIA DO SEXO FETAL SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA EM ÉGUAS ENTRE O 5º E O 8º MÊS DE GESTAÇÃO .....</b>	<b>46</b>

<b>5.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Animais .....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Dosagem de testosterona .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Comitê de ética.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>5.4</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>5.5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>5.6</b>	<b>Referências.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A sexagem fetal consiste no exame utilizado para diagnosticar o sexo do feto antes do nascimento e pode ser realizada por diversas técnicas, de acordo com a espécie e idade gestacional. Em equinos, os métodos empregados a campo utilizam a ultrassonografia transretal e são baseados na identificação e diferenciação de estruturas anatômicas do feto. As técnicas atualmente descritas para a sexagem fetal em equinos incluem: identificação e posicionamento do tubérculo genital por ultrassonografia transretal (CURRAN; GINTHER, 1989), identificação das gônadas fetais e genitália externa por ultrassonografia transretal e/ou transabdominal (RENAUDIN et al., 1997) e detecção de DNA fetal livre circulante no sangue materno (DE LEON et al., 2012).

Apesar das opções disponíveis para a determinação do sexo fetal em éguas prenhes, este exame ainda é subutilizado na reprodução equina. As técnicas atuais exigem equipamentos de alto custo e/ou experiência do examinador, o que restringe sua aplicação. A utilização desta biotecnologia pode ser ampliada caso seja realizada com acurácia, em uma única avaliação e em condições de campo (BELLUZZI, 2002; MARI et al., 2005; AURICH; SCHNEIDER, 2014). Alternativas aos métodos convencionais de sexagem fetal já foram descritos em mulheres, elefantes e vacas, e baseiam-se nos níveis plasmáticos de testosterona nas fêmeas gestantes (MEULENBERG; HOFMAN, 1991; DUER et al., 2002; KIBUSHI et al., 2016). Até o momento não existem estudos relacionando o sexo fetal e as concentrações maternas de testosterona na égua prenhe.

A presente dissertação foi desenvolvida com o intuito de abordar as técnicas descritas para sexagem fetal, comparar as duas mais empregadas na rotina da reprodução equina e sugerir uma nova abordagem diagnóstica. O presente trabalho está dividido em três capítulos: capítulo I – “Sexagem fetal em equinos – revisão bibliográfica”; capítulo II – “Sexagem fetal via tubérculo genital versus avaliação das gônadas fetais,

determinadas por ultrassonografia transretal em éguas da raça Crioula em condições de campo”; e capítulo III – “Influência do sexo fetal sobre as concentrações de testosterona plasmática em éguas entre o 5º e o 8º mês de gestação”.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

- Comparar os resultados a campo da sexagem fetal realizada pelas duas técnicas empregadas com maior frequência na reprodução equina (sexagem pela identificação do tubérculo genital e sexagem pela avaliação das gônadas fetais), ambas realizadas por ultrassonografia transretal.
- Avaliar a influência do sexo fetal sobre as concentrações plasmáticas de testosterona entre 5 e 8 meses de gestação na égua.
- Estabelecer limites de testosterona plasmática materna em éguas gestantes para diagnóstico do sexo fetal.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar as taxas de diagnósticos possíveis, obtidas em uma única avaliação realizada por cada técnica ultrassonográfica.
- Determinar a acurácia para o diagnóstico do sexo fetal, de acordo com a técnica ultrassonográfica empregada.
- Avaliar a variação nas concentrações plasmáticas de testosterona materna, de acordo com o sexo fetal e mês gestacional.
- Determinar valores limites de testosterona plasmática materna para predição do sexo fetal, de acordo com o mês gestacional.
- Determinar o valor preditivo da testosterona materna para os sexos masculino e feminino, de acordo com o mês gestacional.
- Determinar as taxas de detecção, baseadas na testosterona materna, para os sexos masculino e feminino, de acordo com o mês gestacional.

- Determinar a acurácia da predição do sexo fetal baseada na testosterona materna, de acordo com o mês gestacional.

### 3 CAPÍTULO I

## SEXAGEM FETAL EM EQUINOS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Fetal sexing in equines – review

#### RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo abordar as técnicas utilizadas atualmente para o diagnóstico do sexo fetal na espécie equina. A sexagem fetal é uma biotecnologia da reprodução ainda subutilizada na medicina veterinária, possuindo potencial para ampliação de sua aplicação a campo. As técnicas descritas para a realização deste exame em éguas prenhes incluem a identificação e posicionamento do tubérculo genital por ultrassonografia transretal, a identificação das gônadas fetais e genitália externa por ultrassonografia transretal e/ou transabdominal e a detecção de DNA fetal livre circulante no sangue materno. Cada técnica possui vantagens e limitações, as quais são abordadas nesta revisão de literatura.

**Palavras-chave:** cavalos, gestação, reprodução equina, ultrassonografia.

#### ABSTRACT

The objective of the present work is to discuss the techniques currently used for the diagnosis of fetal sex in the equine species. Fetal sexing is a reproduction biotechnology still underutilized in veterinary medicine, possessing the potential to expand its application to the field. The techniques described to performing this examination in pregnant mares include the identification and positioning of the genital tubercle by transrectal ultrasonography, the identification of fetal gonads and external genitalia by transrectal and/or transabdominal ultrasonography, and the detection of free fetal DNA circulating in

maternal blood. Each technique has advantages and limitations, which are addressed in this literature review.

**Key words:** horses, gestation, equine reproduction, ultrasound.

### 3.1 Introdução

A sexagem fetal é uma ferramenta ainda subutilizada na equinocultura brasileira (OLIVEIRA et al., 2014), no entanto, o interesse por esta técnica tem se mostrado crescente na reprodução equina. A preferência por produtos de determinado sexo varia de acordo com a opção do proprietário, sendo influenciada pela atividade a qual a raça se destina (AURICH; SCHNEIDER, 2014). Embora os motivos pelo interesse na determinação do sexo fetal sejam variados, a sexagem é essencialmente uma ferramenta de gestão que auxilia a tomada de decisões estratégicas pelo criador. O sexo do produto pode definir a venda ou não de uma égua prenhe, assim como seu valor de mercado. Também pode afetar o valor do seguro e nortear futuros acasalamentos (CURRAN, 1992; AURICH; HOLDER, 2003; MCGLADDERY, 2011; SCHNEIDER, 2014).

Alguns garanhões são reconhecidos por produzirem fêmeas de qualidade, mas não machos (ou vice-versa), desta forma, sabendo-se o sexo do feto, o criador pode decidir utilizar garanhões diferentes ou insistir no mesmo reprodutor na temporada seguinte (RENAUDIN et al., 1997; CARMO et al., 2008). Apesar das aplicações da técnica, é importante salientar que a sexagem é um exame para o diagnóstico do sexo fetal e não para sua seleção. Considerando que tal exame é realizado após a formação dos cálices endometriais, a indução do aborto visando uma nova prenhez na mesma temporada, caso o feto não seja do sexo desejado, é impraticável (MCGLADDERY, 2011).

As técnicas utilizadas atualmente para realização da sexagem fetal em equinos são: identificação e posicionamento do tubérculo genital por ultrassonografia transretal (CURRAN; GINTHER, 1989), identificação das gônadas fetais e genitália externa por ultrassonografia transretal e/ou transabdominal (RENAUDIN et al., 1997) e detecção de DNA fetal livre circulante no sangue materno (DE LEON et al., 2012). Cada técnica possui suas vantagens e limitações, as quais são abordadas nesta revisão de literatura.

### **3.2 Desenvolvimento**

#### **3.2.1 Sexagem Fetal pela identificação do tubérculo genital**

A sexagem fetal pela identificação e posicionamento do tubérculo genital foi primeiramente relatada em bovinos, por Curran et al. (1989). No mesmo ano, Curran e Ginther descreveram a técnica em equinos. O tubérculo genital é a estrutura embrionária que origina o clitóris nas fêmeas e o pênis nos machos. Essa estrutura pode ser identificada em fetos equinos, por ultrassonografia transretal, a partir dos 53-54 dias de gestação, caracterizada por uma imagem hiperecótica, de 2 mm de diâmetro e geralmente bilobulada (algumas vezes visualizada em forma de V), a qual se torna trilobulada com o decorrer dos dias (entre 80 e 88 dias) (CURRAN; GINTHER, 1989; CURRAN et al., 1989).

O tubérculo genital é inicialmente identificado entre os membros pélvicos do feto e durante a diferenciação ocorre sua migração em direção à cauda, nas fêmeas, ou em direção ao cordão umbilical, nos machos (CURRAN, 1992). A sexagem por meio desta técnica é realizada entre 55 e 90 dias de gestação (HOLDER, 2003), sendo o período ótimo situado entre 59 e 68 dias após a ovulação (CURRAN; GINTHER, 1989). Em fetos jovens (menos de 59 dias) a migração do tubérculo geralmente é insuficiente para uma sexagem acurada. Em fetos mais velhos, algumas vezes, não é possível obter uma

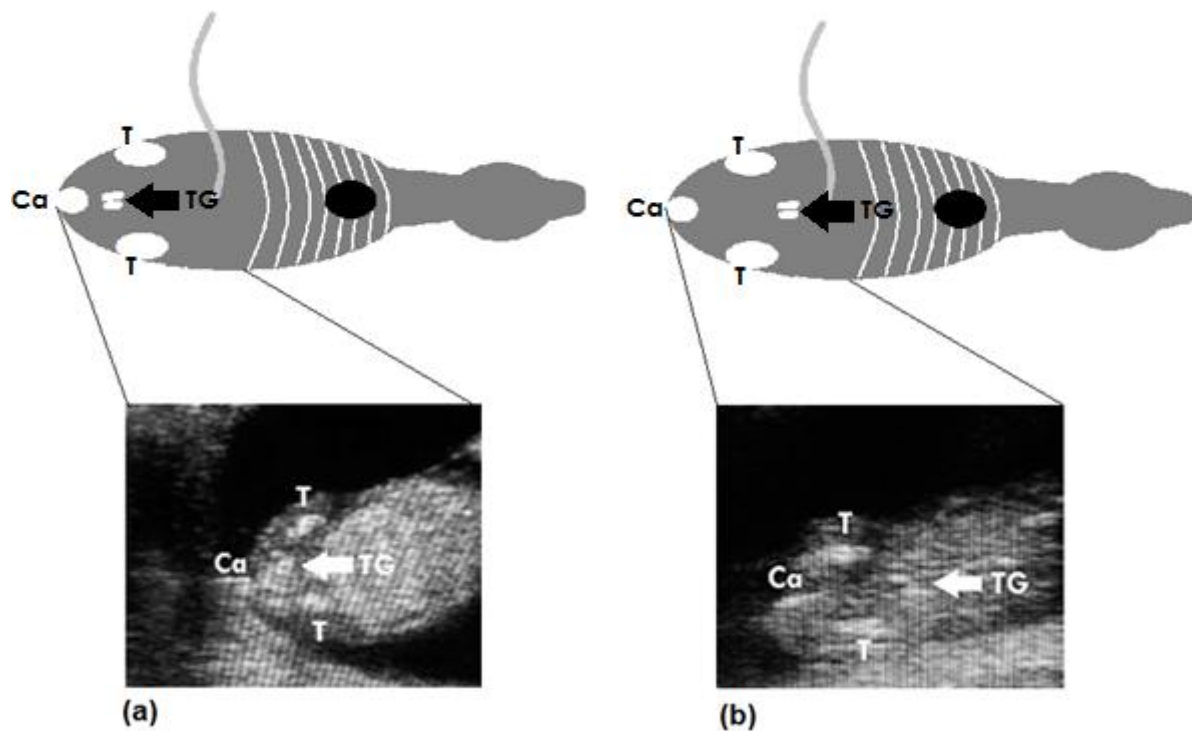
visualização adequada da referida estrutura, o que dificulta ou impossibilita o diagnóstico (CURRAN; GINTHER, 1991; CURRAN, 1992). A partir dos 68-75 dias de gestação, o acesso ao feto se torna progressivamente mais difícil, devido ao maior volume de fluido no útero (levando a sua descida além do bordo da pelve) e ao posicionamento do feto nas regiões mais ventrais do mesmo (HOLDER, 2000; RENAUDIN, 2000; MCGLADDERY, 2011).

Durante a avaliação ultrassonográfica existem algumas estruturas que se assemelham ao tubérculo genital, podendo confundir o profissional. Para minimizar os erros, recomenda-se que o exame seja orientado de acordo com os seguintes pontos de referência: coração (identificação dos batimentos cardíacos), cordão umbilical (detecção da pulsação), membros pélvicos e cauda. Uma vez definidos os pontos de referência, deve-se identificar o tubérculo genital e determinar sua localização. É recomendável que esta visualização seja realizada, no mínimo, três vezes para que se obtenha um elevado nível de certeza no resultado da sexagem (CURRAN; GINTHER, 1991).

A determinação do posicionamento relativo do tubérculo depende do plano de visualização do feto à ultrassonografia. A identificação desta estrutura geralmente é difícil em imagens obtidas por cortes sagitais. Em imagens de cortes transversais, a morfologia bilobulada do tubérculo se torna mais distinta. Recomenda-se a localização da cabeça ou dos batimentos cardíacos fetais, em corte transversal, seguida da movimentação do transdutor em direção à cauda do feto, obtendo, desta forma, cortes sequenciais (CURRAN; GINTHER, 1989).

Na prática, buscam-se imagens frontais e transversais da extremidade caudal do feto. Nas fêmeas, em cortes transversais que permitam a visualização da cauda (imagem hiperecótica) e das duas tíbias (círculos hiperecóticos), formando um triângulo, o tubérculo genital pode ser identificado no centro deste, ligeiramente mais próximo à base da cauda

(Figura 1a). Nos machos não haverá nenhuma estrutura visível nesta região, desta forma, o transdutor deve ser movido em direção cranial até a visualização do tubérculo genital entre os membros pélvicos e o cordão umbilical, logo à frente (Figura 1b) (MCGLADDERY, 2011; TURNER, 2013).



**FIGURA 1** – Imagens ultrassonográficas obtidas durante a sexagem fetal pela técnica da identificação do tubérculo genital. (a) feto fêmea - tubérculo genital caudalmente aos membros pélvicos, próximo à base da cauda, no centro do triângulo formado pelas duas tíbias e a cauda; (b) feto macho - tubérculo genital localizado cranialmente aos membros pélvicos. T - Tíbia, Ca - Cauda, TG - Tubérculo Genital.

Dentre os problemas frequentemente encontrados durante o exame estão a identificação errônea dos ossos da pelve como o tubérculo genital, o mau posicionamento do transdutor em relação ao feto, éguas não cooperativas e fetos com mobilidade excessiva (TURNER, 2013). Para que o exame seja conduzido adequadamente é importante a contenção correta da égua, preferencialmente em troncos específicos. Embora geralmente não seja necessária (LIVINI, 2010), a sedação é recomendada por alguns autores antes do procedimento, com o intuito de reduzir a movimentação tanto da

égua quanto do feto (TURNER, 2013). No entanto, a tranquilização pode prejudicar o exame, uma vez que também promove um relaxamento uterino, dificultando seu acesso. Considerando que a palpação para a sexagem costuma ser mais profunda, em éguas muito tensas o relaxamento retal pode ser induzido com drogas como a escopolamina (MCGLADDERY, 2011).

O posicionamento fetal no útero também exerce influência sobre o sucesso do exame. Quando a posição do feto dificulta ou impede a formação de imagens adequadas, pode ser necessário interromper o exame e reiniciá-lo em outro momento ou aguardar que ele se mova. A movimentação excessiva deste pode atrapalhar, pois, geralmente, permite imagens adequadas somente por instantes. Nestes casos, a gravação dos exames realizados, para posterior análise, é uma estratégia utilizada para facilitar a avaliação e aumentar a acurácia dos diagnósticos (MERKT et al., 1999).

A sexagem fetal pelo tubérculo genital apresenta melhores resultados quando realizada em bovinos. O maior grau de dificuldade para a realização do exame na espécie equina se deve à grande quantidade de líquido alantoideano, ao cordão umbilical longo e à alta mobilidade fetal (CARMO et al., 2008). Além disso, éguas são menos tolerantes a exames retais prolongados, os quais muitas vezes são necessários para a obtenção de resultados precisos (MARI et al., 2002). No entanto, quando realizada por profissionais experientes e em condições otimizadas, a acurácia desta técnica de sexagem pode alcançar valores próximos a 100% (CURRAN; GINTHER, 1989).

As condições otimizadas para o exame incluem: uso de equipamento de ultrassonografia de alta qualidade; luminosidade externa reduzida; equipamento próximo ao examinador e ao nível dos olhos; éguas tolerantes ao exame retal e com movimentação mínima (CURRAN; GINTHER, 1989). Recomenda-se o uso de equipamento de ultrassonografia de alta resolução, com transdutor linear de 5 ou 7,5 MHz



(TURNER, 2013). A identificação do tubérculo genital por meio da ultrassonografia tridimensional foi descrita em estudo realizado por Kotoyori et al. (2012), no entanto, este tipo de equipamento não faz parte da rotina dos médicos veterinários.

Os resultados de sexagem fetal pelo tubérculo genital encontrados na literatura, relativos a estudos realizados em condições ótimas e em condições de campo, variam entre 65 e 97,6% de acurácia. Para a obtenção do diagnóstico é necessária a visualização adequada do feto, a qual nem sempre é obtida e depende, além de outros fatores, da idade gestacional. O percentual médio de exames que permitem diagnósticos é de 80 a 90%, no entanto estes valores também apresentam discrepância entre pesquisadores, variando entre 50 e 100% (Tabela 1) (CURRAN; GINTHER, 1989, 1991; CURRAN, 1992; MERKT et al., 1999; MARI et al., 2002; HOLDER, 2003; TAVEIROS et al., 2008; LIVINI, 2010).

**TABELA 1** – Resultados de sexagem fetal em equinos pela identificação e posição do tubérculo genital, obtidos em diferentes estudos.

Nº de exames realizados	Idade fetal	Condições do exame	Diagnósticos possíveis	Acurácia	Referência
82	59-68 dias	Otimizadas	(82/82) 100%	(80/82) 97,6%	CURRAN; GINTHER, 1989
85	50-99 dias	Campo	(75/85) 88,2%	(73/75) 97,3%	CURRAN; GINTHER, 1991
195	50-70 dias	Otimizadas; gravação em vídeo	(99/195) 50,8%	(84/99) 84,8%	MERKT et al., 1999
40	54-89 dias	Campo	(35/40) 87,5%	(26/35) 65%	MARI et al., 2002
157	58-69 dias	Não consta	(131/157) 83,4%	(118/131) 90,1%	TAVEIROS et al., 2008
232	55-70 dias	Campo; tempo máximo por exame = 150 segundos	(208/232) 89,7%	(203/208) 97,6%	LIVINI, 2010

As principais desvantagens da técnica pela identificação do tubérculo genital são a necessidade de considerável experiência pelo examinador e o curto intervalo para

diagnóstico (10 dias de período ótimo) (RENAUDIN et al., 1997). Com o objetivo de superar estes obstáculos, principalmente em relação ao período hábil para o diagnóstico, outras técnicas foram desenvolvidas.

### **3.2.2 Sexagem Fetal pela identificação das gônadas fetais e genitália externa**

Entre o 90° e o 220° dias de gestação a sexagem pode ser realizada por ultrassonografia transretal e/ou transabdominal. Apesar de fornecerem diagnósticos mais tardios, quando comparadas à técnica do tubérculo genital, essas abordagens têm como uma das principais vantagens o maior intervalo diagnóstico (RENAUDIN et al., 1999; BUCCA, 2005). A determinação do sexo fetal nesta fase gestacional é baseada na visualização dos testículos, prepúcio ou pênis, escroto e uretra nos machos e ovários, glândula mamária, tetos e vulva/clitóris nas fêmeas (RENAUDIN et al., 1997; BUCCA, 2005).

Por volta dos 90 dias, a sexagem dificilmente é realizada, pois nesta fase gestacional há um grande volume de fluido alantoideano e o feto, ainda relativamente pequeno, é de difícil acesso. Entre 100 e 150 dias, com o crescimento fetal, a identificação da maioria das estruturas é possível pelo acesso transretal (LIVINI, 2010), possibilitando diagnósticos precisos em 90% dos exames, com até 99% de acurácia (HOLDER, 2003). Até o 5°-6° mês de gestação, a técnica transretal é adequada e apresenta alta acurácia. No entanto, a partir do 7° mês a maioria dos fetos assume uma apresentação anterior, tornando a pelve inacessível por palpação retal, o que impossibilita o diagnóstico (CURRAN; GINTHER, 1993).

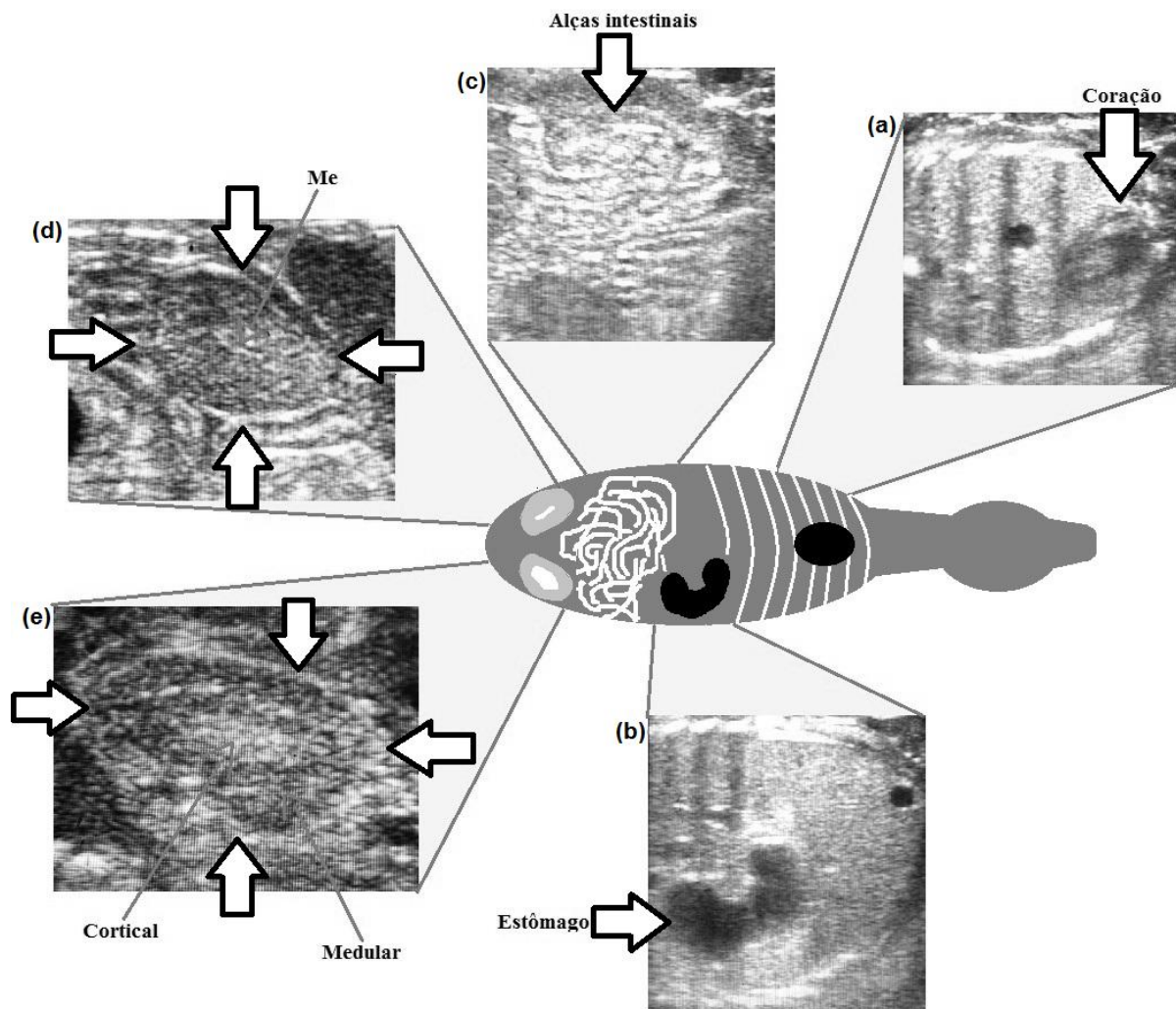
Considerando os obstáculos descritos acima, em gestações mais avançadas a sexagem é realizada por ultrassonografia transabdominal (HOLDER, 2003). Após 220

dias de gestação aumenta a dificuldade na identificação da genitália externa nos machos e glândula mamária nas fêmeas, devido ao grande tamanho fetal. Desta forma, em fases finais de gestação o número de diagnósticos possíveis é menor (RENAUDIN et al., 1999). Entre 181 e 270 dias de gestação, Renaudin et al. (1999) obtiveram apenas 6% de sucesso na sexagem pelo acesso transretal e 56% pelo transabdominal.

A visualização fetal por ultrassonografia transretal requer um profissional habituado à palpação retal e à avaliação ultrassonográfica do trato reprodutivo da égua. Para a técnica transabdominal o abdômen precisa estar limpo e, quando necessário, deve-se realizar tricotomia. Para um exame adequado as éguas devem estar devidamente contidas, sendo a sedação geralmente desnecessária. Uma boa técnica para a identificação das estruturas de interesse inicia com a localização da cabeça, tórax, coração, estômago e alças intestinais, a partir dos quais se determina a orientação cranial e caudal do feto (Figura 2). Movendo o transdutor a partir do tórax em direção caudal, deve-se realizar a varredura do abdômen e região pélvica para identificação dos órgãos sexuais de interesse (BUCCA, 2005).

A identificação da genitália externa é mais difícil no período entre 90 e 110 dias, pois nesta fase ainda não se encontra bem desenvolvida. Nos machos o prepúcio é visualizado como uma estrutura cônica, contendo duas linhas hiperecóticas paralelas, localizada caudalmente à inserção do cordão umbilical. A glândula do pênis pode ser identificada como uma massa hiperecótica na parte anterior do prepúcio (HOLDER, 2000). A diferenciação entre pênis e prepúcio é difícil, exceto quando ocorre ereção. Em cortes frontais, o escroto pode ser identificado na forma de dois compartimentos hipoecóticos vazios entre os membros pélvicos. Os testículos fetais possuem formato oval e 2 a 7 cm de comprimento, dependendo do estágio da gestação. Eles se localizam na porção caudoventral do abdômen, apresentam um parênquima homogêneo e uma fina linha

ecogênica central, a qual não é bem identificada após os 125 dias (Figura 2) (RENAUDIN et al., 1999).



**FIGURA 2** – Imagens ultrassonográficas obtidas durante a realização da sexagem fetal pela avaliação das gônadas fetais. (a) tórax fetal com destaque para o coração (seta); (b) estômago fetal (estrutura anecóica no abdômen, com formato de feijão - seta); (c) alças intestinais no interior do abdômen (seta); (d) gônada fetal masculina (testículo - setas) com o parênquima homogêneo e uma fina linha ecogênica central (Me – mediastino); (e) gônada fetal feminina (ovário – setas) com as camadas medular e cortical bem delimitadas.

Nas fêmeas, a glândula mamária é a estrutura de melhor identificação. Essa pode ser visualizada, na mesma região do prepúcio nos machos, a partir dos 90 dias de gestação, produzindo uma imagem levemente mais ecogênica que as estruturas ao seu redor. Possui forma triangular bilobulada, apresentando dois pontos hiperecóicos (tetos).

O clitóris aparece como uma pequena estrutura hiperecólica na região ventral, posterior, mediana (HOLDER, 2000). Os ovários possuem formato oval, tamanho e localização similares aos testículos. Apresentam um centro hiperecólico (cortical), separado da periferia ecogênica (medular) por uma linha homogênea, bem visualizada até os 134 dias de gestação (Figura 2) (RENAUDIN; GILLIS; TARANTAL, 1999).

A utilização de aparelhos de ultrassonografia com a função “Colour Doppler”, mais sofisticados, permite a identificação do plexo pampiniforme e da veia testicular nas gônadas masculinas. Da mesma forma, possibilita a visualização da vascularização presente entre as camadas cortical e medular dos ovários nos fetos do sexo feminino. Esta ferramenta pode ser utilizada para aumentar a acurácia do diagnóstico do sexo fetal, principalmente nos casos de fetos do gênero masculino (RESENDE et al., 2014).

A abordagem transretal pode ser difícil em éguas de maior tamanho, pois o útero gravídico encontra-se mais profundo e, portanto, menos acessível à palpação (CARMO et al., 2008). Os equipamentos recomendados para a realização desse exame são os mesmos utilizados na técnica do tubérculo genital. Para a técnica transabdominal é necessária a utilização de equipamentos de ultrassonografia mais potentes (HOLDER, 2003). Recomenda-se um equipamento de boa qualidade, sendo um transdutor linear de 5 MHz utilizado para fetos de até 160 dias, e um de 3,5 MHz para fetos de maior idade (onde uma maior penetração é necessária) (RENAUDIN, 2000).

A abordagem transbdominal, por ser menos invasiva, apresenta algumas vantagens em relação às técnicas que necessitam de palpação retal. Destacam-se a segurança para a égua, uma vez que o risco de lesão retal é eliminado, e a possibilidade de realizar exames mais longos (pois não há preocupação com o tempo, como ocorre na palpação retal). Desta forma, tal técnica é aplicável a éguas intolerantes ao exame retal, àquelas

que o proprietário receia a palpação e também às éguas pequenas (como pôneis), nas quais a palpação é difícil ou impossível (RENAUDIN et al., 1999).

### **3.2.3 Sexagem Fetal pela detecção de DNA fetal livre circulante**

Outra técnica pouco invasiva já descrita para determinação do sexo fetal em equinos é realizada pela detecção de DNA fetal livre circulante (*ccffDNA*) no sangue da égua prenhe. Esta técnica utiliza ferramentas de biologia molecular (reação em cadeia da polimerase – PCR) para detecção do gene SRY (sex determining region Y), presente em indivíduos do sexo masculino. Tal método foi estudado apenas durante os três últimos meses de gestação e apresentou especificidade de 90,9% e acurácia de 95%. A sexagem por esta técnica, por ser pouco invasiva, gera riscos mínimos para a égua e feto, visto que requer apenas coleta de sangue materno (DE LEON et al., 2012), no entanto são necessários equipamentos sofisticados de biologia molecular para sua realização, sendo utilizada atualmente apenas em pesquisas. Outra desvantagem da técnica é o período em que ela é realizada, sendo o mais tardio dentre os métodos descritos neste trabalho.

## **3.3 Conclusões**

A realização da sexagem fetal na reprodução equina apresenta grande potencial de ampliação, uma vez que atualmente é subutilizada. O maior conhecimento dos criadores, em relação às técnicas disponíveis e suas aplicações, pode levar a um incremento na demanda. A necessidade de experiência por parte dos médicos veterinários é um fator limitante, desta forma, a capacitação e treinamento dos profissionais são essenciais para a obtenção de resultados confiáveis.

### 3.4 Referências

AURICH, C.; SCHNEIDER, J. Sex determination in horses-Current status and future perspectives. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 1–2, p. 34–41, 2014.

BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 568–571, 2005.

CARMO, M.T.; OLIVEIRA, J.V.; ALMEIDA, M.T. et al. Avaliação ultra-sonográfica da gônada fetal em equinos: uma nova alternativa para sexagem. **Anais IX Conferência Anual ABRAVEQ**, 2008.

CURRAN, S. Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 17–21, 1992.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 1989.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 809–814, 1991.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic fetal gender diagnoses during months 5 to 11 in mares. **Theriogenology**, v. 40, p. 1127–1135, 1993.

CURRAN, S.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Determining Sex of the Bovine Fetus by Ultrasonic Assessment of the Relative Location of the Genital Tubercle. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 217–227, 1989.

DE LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.F.; DELLAGOSTIN, O.A. et al. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). **Theriogenology**, v. 77, n. 3,

p. 694–698, 2012.

HOLDER, R. D. Fetal sex determination in the mare between 55 and 150 days gestation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 46, p. 321-324, 2000.

HOLDER, R. D. Fetal Sex Determination. **Current Therapy in Equine Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 8741, 2003.

KOTOYORI, Y.; YOKOO, N.; ITO, K. et al. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1480–1486, 2012.

LIVINI, M. Determination of Fetal Gender by Transrectal Ultrasound Examination : Field ' s Experience. **AAEP Proceedings**, v. 56, p. 323-327, 2010.

MARI, G.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1237–1243, 2002.

MCGLADDERY, A. Equine Fetal Sex Determination. **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, p. 113-115, 2011.

MERKT, H.; MOURA, J. C.; JÖCHLE, W. Gender determination in equine fetuses between days 50 and 90 of pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 90–94, 1999.

OLIVEIRA, R.A.; YAMIM, R.S.; PIVATO, I. et al. Sexagem fetal em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 37–42, 2014.

RENAUDIN, C. D. Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender. In: BALL, B.A. **Recent Advances in Equine Reproduction**, International Veterinary Information Service, 2000.



RENAUDIN, C. D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal Combined with Transrectal Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender During Midgestation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 43, p. 252-255, 1997.

RENAUDIN, C. D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 6, p. 483–487, 1999.

RESENDE, H.L.; CARMO, M.T.; NETO, C.R. et al. Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. **Equine veterinary journal**, v. 46, p. 756–758, 2014.

TAVEIROS, A.W.; NETO, L.M.F.; FILHO, C.R.A. et al. Utilização do ultrassom para sexar fetos equinos da raça Mangalarga Marchador pela visualização do tubérculo genital e da genitália. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 4, p. 35–40, 2008.

TURNER, R. M. Fetal Sexing for the Practitioner. **Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium**, p. 119-124, 2013.

## 4 CAPÍTULO II

### SEXAGEM FETAL VIA TUBÉRCULO GENITAL VERSUS AVALIAÇÃO DAS GÔNADAS FETAIS, DETERMINADAS POR ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Fetal sexing via genital tubercle versus evaluation of fetal gonads, as determined by transrectal ultrasonography in Crioulo mares under field conditions

#### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficácia da sexagem fetal pelo tubérculo genital com a sexagem baseada na avaliação das gônadas fetais em equinos, quando realizadas em condições de campo. Foram utilizadas 27 éguas da raça Crioula, as quais foram submetidas aos referidos exames de sexagem fetal por ultrassonografia transretal em dois momentos distintos. Foi realizada uma única avaliação por técnica em cada animal e o sexo dos potros foi confirmado ao nascimento. A sexagem pela identificação e posicionamento do tubérculo genital ocorreu entre 59 e 65 dias de gestação, resultando em uma taxa de diagnósticos possíveis de 51,9% (14/27) e acurácia de 85,7% (12/14). A sexagem baseada na avaliação das gônadas fetais foi realizada entre 117 e 126 dias de gestação, sendo a taxa de diagnósticos possíveis 88,9% (24/27) e a acurácia 83,3% (20/24). A acurácia de ambas as técnicas não apresentou diferença estatística ( $P=0,85$ ), no entanto a taxa de diagnósticos possíveis foi superior pela técnica baseada nas gônadas fetais ( $P=0,003$ ). Conclui-se que, em condições de campo, a sexagem fetal pela avaliação das gônadas fetais apresentou melhor eficácia que a identificação do tubérculo genital, em função da maior taxa de diagnósticos possíveis.

**Palavras-chave:** diagnóstico; equinos; feto; reprodução

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare the efficacy of fetal sexing by genital tubercle with sexing based on the evaluation of fetal gonads in equines when performed under field conditions. A total of 27 Crioulo breed mares were used, which were submitted to the referred examinations of fetal sexing by transrectal ultrasonography at two different times. A single technique evaluation was performed on each animal and the sex of the foals was confirmed at birth. The sexing by the identification and positioning of the genital tubercle occurred between 59 and 65 days of gestation, resulting in a possible diagnosis rate of 51.9% (14/27) and accuracy of 85.7% (12/14). The sexing based on the evaluation of fetal gonads was performed between 117 and 126 days of gestation, with the possible diagnosis rate being 88.9% (24/27) and the accuracy 83.3% (20/24). The accuracy of both techniques did not present statistical difference ( $P = 0.85$ ), however, the possible diagnosis rate was higher by the technique based on the fetal gonads ( $P = 0.003$ ). It was concluded that, under field conditions, fetal sexing through the evaluation of fetal gonads presented better efficacy than the identification of the genital tubercle, due to the higher rate of possible diagnosis.

**Key words:** diagnostic; equine; fetus; reproduction

### 4.1 Introdução

A sexagem fetal consiste no exame utilizado para diagnosticar o sexo do feto antes do nascimento (*in utero*) e pode ser realizada por diferentes técnicas, de acordo com a idade gestacional e espécie em questão. Em equinos, os dois métodos mais empregados a campo utilizam a ultrassonografia transretal e são baseados na identificação e

diferenciação de estruturas anatômicas do feto, de acordo com a fase de desenvolvimento em que esse se encontra.

A primeira técnica pode ser realizada entre os 59 e 68 dias de gestação pela identificação e posicionamento do tubérculo genital, estrutura que dá origem ao pênis, nos machos, e ao clitóris, nas fêmeas. Esse método foi descrito por Curran e Ginther (1989) e é o mesmo utilizado para a sexagem fetal em bovinos (CURRAN et al., 1989). A segunda técnica geralmente é realizada entre os dias 100 e 150 de gestação e baseia-se na identificação e diferenciação das gônadas fetais e genitália externa (CURRAN; GINTHER, 1993; RENAUDIN et al., 1997; BUCCA, 2005; LIVINI, 2010).

A sexagem fetal é pouco difundida na rotina da reprodução equina. A dificuldade na localização do tubérculo genital e do curto período ótimo para diagnóstico constituem obstáculos. Por esses motivos, alguns profissionais optam pelo diagnóstico mais tardio (avaliação das gônadas e genitália externa), pois esse apresenta maior facilidade na execução e intervalo diagnóstico mais amplo (BUCCA, 2005; CARMO et al., 2008).

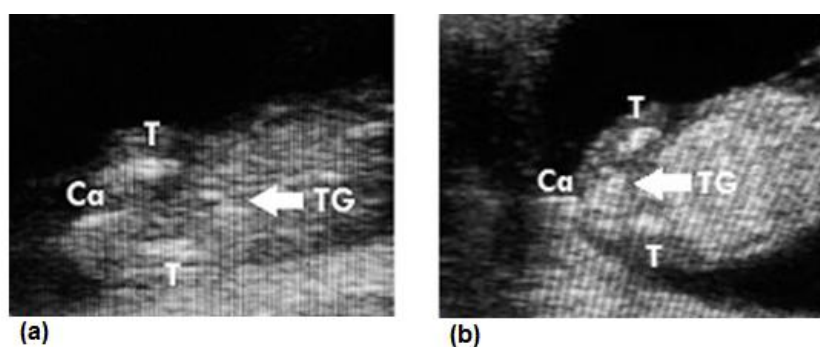
A acurácia dos diagnósticos pode variar de acordo com as condições do ambiente, experiência do médico veterinário e características das éguas avaliadas (tolerantes ou não a exames retais prolongados). Para a obtenção de bons resultados preconiza-se a otimização destas condições, recomendando-se a realização dos exames em locais com luminosidade reduzida, equipamento de ultrassonografia de alta qualidade, localizado próximo ao examinador e ao nível dos olhos (CURRAN; GINTHER, 1989, 1991). Na rotina da reprodução a campo estas condições nem sempre são possíveis, podendo refletir em reduzidas taxas de diagnóstico e acurácia dos exames.

O presente estudo objetivou comparar a eficiência da sexagem fetal pela identificação do tubérculo genital e pela avaliação das gônadas fetais em éguas via ultrassonografia transretal.

## 4.2 Material e métodos

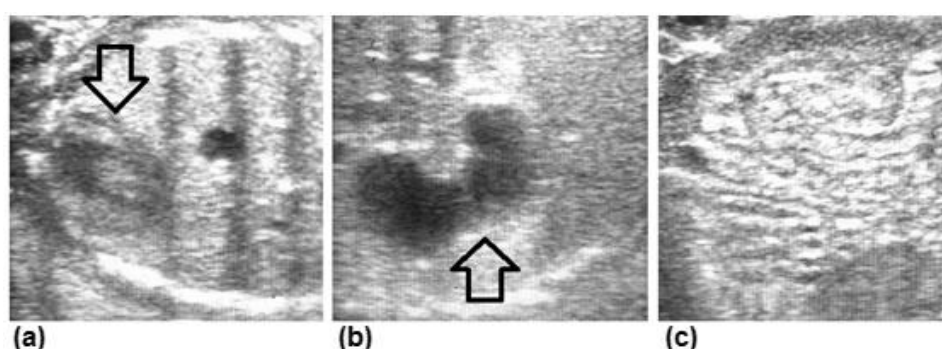
O experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do setor de ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná (protocolo número 117/2016). Foram utilizadas 27 éguas da raça Crioula, com idades entre 4 e 19 anos, alojadas em uma cabanha situada à latitude 25°32'84''S e longitude 49°87'84''W. As éguas foram cobertas ou inseminadas com 5 diferentes garanhões da raça Crioula e as datas de ovulação (D0) foram anotadas. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas por um único profissional com experiência em reprodução equina. Os exames foram executados com um equipamento de ultrassonografia (SonoScape A5V, China), equipado com transdutor linear de 5MHz. Todos os exames foram realizados em condições de campo: ambiente coberto, sem controle da luminosidade externa e monitor levemente abaixo do nível dos olhos.

A primeira ultrassonografia para identificação do sexo fetal ocorreu entre os dias 59 e 65 de gestação, sendo realizada apenas uma avaliação por égua durante este período. Os critérios para a execução desse exame foram baseados nos descritos por Curran e Ginther (1989). A partir da ultrassonografia transretal buscou-se identificar o tubérculo genital (TG) dos fetos e determinar sua localização relativa aos membros pélvicos e cauda. Quando o TG era detectado cranialmente aos membros pélvicos o feto era considerado macho (Figura 1a) e quando o TG era identificado caudalmente aos membros pélvicos, próximo à cauda do feto, era considerado fêmea (Figura 1b).



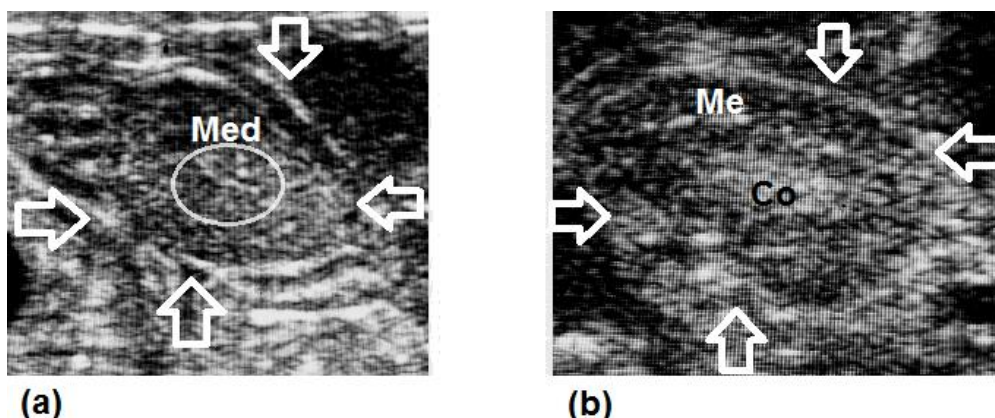
**FIGURA 1** – Imagens ultrassonográficas de fetos equinos aos 60 dias de gestação. (a) feto macho (tubérculo genital cranialmente aos membros pélvicos); (b) feto fêmea (tubérculo genital caudalmente aos membros pélvicos, próximo à base da cauda, no centro do triângulo formado pelas duas tíbias e a cauda). T - Tíbia, Ca - Cauda, TG - Tubérculo Genital.

A segunda ultrassonografia para identificação do sexo fetal ocorreu entre os dias 117 e 126 de gestação, sendo realizada apenas uma avaliação por égua nesse período. Esse exame foi realizado sem que o profissional consultasse os resultados da sexagem obtidos durante a primeira avaliação. Os critérios para a execução desse exame foram baseados nos descritos por Renaudin et al. (1999) e Bucca (2005). A partir da ultrassonografia transretal buscou-se identificar e diferenciar as gônadas fetais. Para isto, primeiramente localizava-se a cabeça e tórax/coração do feto (Figura 2a) e então movia-se o transdutor em direção ao abdômen, onde observava-se o estômago (Figura 2b) e em seguida as alças intestinais (Figura 2c). Na região caudal do abdômen, próximas às alças intestinais, buscavam-se as gônadas fetais (Figura 3).



**FIGURA 2** – Imagens ultrassonográficas de feto equino aos 120 dias de gestação. (a) tórax fetal, com destaque para o coração (seta); (b) estômago (estrutura anecóica no abdômen, com formato de feijão - seta); (c) alças intestinais no interior do abdômen (imagem hiperecólica).

Quando as gônadas apresentavam ecogenicidade homogênea e uma fina linha ecogênica central (mediastino testicular) eram interpretadas como testículos (Figura 3a), sendo o feto considerado macho; quando as gônadas apresentavam a periferia ecogênica e o centro hiperecótico, delimitados por uma linha homogênea, eram interpretadas como ovários (Figura 3b) e o feto era considerado fêmea (Renaudin et al.,1999). A idade gestacional e os resultados de todos os exames foram anotados e o sexo dos potros foi confirmado ao nascimento pela visualização da genitália externa. A taxa de diagnósticos possíveis por cada técnica e acurácia dos exames foram comparadas estatisticamente utilizando o teste do qui-quadrado, com nível de significância determinado para  $P < 0,05$ .



**FIGURA 3** – Imagens ultrassonográficas das gônadas fetais de equinos aos 120 dias de gestação. (a) gônada fetal masculina (testículo - setas) com o parênquima homogêneo e uma fina linha ecogênica central (Med – mediastino testicular); (b) gônada fetal feminina (ovário – setas) com as camadas medular (Me) e cortical (Co) bem delimitadas.

#### 4.3 Resultados e discussão

Das 27 éguas utilizadas no experimento, 21 (77,8%) pariram potros do sexo feminino e 6 (22,2%), potros do sexo masculino. O sexo fetal pôde ser diagnosticado em 14 (51,9%) dos 27 fetos pela técnica do tubérculo genital (Tabela 1), resultado similar aos 50,8% obtidos por Merkt et al. (1999) em estudo realizado em condições otimizadas. Dentre as dificuldades encontradas na execução do exame, as quais impossibilitaram a realização do diagnóstico em 13 fetos (48,1%), destacam-se o temperamento inquieto de

algumas éguas e a movimentação excessiva dos fetos ou mau posicionamento desses no útero. Nas éguas inquietas, pouco tolerantes ao exame retal, interrompia-se a avaliação quando estas demonstravam sinais de desconforto. Embora alguns autores recomendem a sedação dos animais, com acepromazina e xilazina ou detomidina (TURNER, 2013), optou-se por não realizá-la devido aos possíveis efeitos sobre os fetos, visto que os sedativos utilizados em equinos atravessam a barreira placentária (HUBBELL, 2011).

**TABELA 1** – Resultados da sexagem fetal realizada pela identificação do tubérculo genital e pela diferenciação das gônadas fetais em éguas da raça Crioula.

<b>Técnica</b>	<b>n</b>	<b>Diagnósticos possíveis</b>	<b>Acurácia total</b>
<b>TG</b>	27	14 (51,9%) <sup>a</sup>	12/14 (85,7%) <sup>c</sup>
<b>Gônadas</b>	27	24 (88,9%) <sup>b</sup>	20/24 (83,3%) <sup>c</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam nível de significância de  $P < 0,05$  n=número de exames realizados; TG=Tubérculo genital.

A grande quantidade de líquido alantoideano no útero da égua prenhe, quando comparada à espécie bovina, torna a sexagem fetal pelo tubérculo genital mais difícil em equinos. Além disso, os fetos equinos apresentam alta mobilidade e longo cordão umbilical, dificultando a obtenção de imagens ultrassonográficas adequadas para o diagnóstico (CARMO et al., 2008). No presente trabalho houve maior dificuldade na visualização dos fetos posicionados nas porções mais ventrais do útero, pois nesses casos o grande volume de líquido alantoideano entre o feto e o transdutor interferia na qualidade das imagens. Fetos com movimentação excessiva também prejudicaram o diagnóstico, visto que a identificação do tubérculo genital era mais difícil, ou impossível, nesses.

A acurácia da sexagem pelo tubérculo genital no presente estudo foi de 85,7% (12 dos 14 diagnósticos foram corretos) (Tabela 1). Tal valor foi semelhante aos 90,1% relatados por Taveiros et al. (2008) e aos 84,4% obtidos por Merkt et al. (1999), apesar de estes últimos terem realizado seus estudos em condições otimizadas (melhores que as



condições de campo do presente trabalho). Mari et al. (2002) também trabalharam em condições de campo, no entanto obtiveram 65% de acurácia, o que pode ser justificado pelo intervalo diagnóstico estabelecido por esses autores (54 a 89 dias de gestação), o qual não condiz com o período ótimo (59 a 68 dias) (CURRAN; GINTHER, 1989). Valores de acurácia superiores, próximos a 100%, podem ser obtidos em exames realizados por profissionais experientes e em condições otimizadas. Nestas condições, Curran e Ginther obtiveram 97,6% de acurácia em estudo realizado em 1989 e 97,3% em 1991. Livini (2010) relatou sua experiência profissional com sexagem fetal durante 2 anos de trabalho a campo, nos quais obteve uma acurácia de 97,6% nos exames realizados.

Dentre os 10 fetos diagnosticados como fêmeas pela técnica do tubérculo genital, 9 se confirmaram fêmeas ao nascimento, resultando em uma acurácia de 90% para o sexo feminino. Pela mesma técnica, 3 dos 4 fetos diagnosticados como machos se confirmaram machos ao nascimento, sendo assim, a acurácia desse exame para o sexo masculino foi de 75% (Tabela 2). A menor acurácia para o sexo masculino difere dos dados encontrados na literatura, que relatam maiores erros na determinação do sexo em fêmeas (MERKT et al., 1999; MARI et al., 2002). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $P=0,47$ ) e provavelmente se deva ao pequeno número de fetos machos resultantes das gestações avaliadas (4 machos em 14 fetos diagnosticados), uma vez que não foi notada maior dificuldade relacionada a um ou outro sexo durante a realização dos exames.

**TABELA 2** – Resultados da sexagem fetal realizada pela identificação do tubérculo genital e pela diferenciação das gônadas fetais em éguas da raça Crioula, de acordo com o sexo do feto.

Técnica	n	Diagnósticos possíveis	Fêmeas nascidas	Acurácia fêmeas	Machos nascidos	Acurácia machos
<b>TG</b>	27	14	10	9/10 (90%) <sup>A</sup>	4	3/4 (75%) <sup>A</sup>
<b>Gônadas</b>	27	24	18	17/18 (94,4%) <sup>B</sup>	6	3/6 (50%) <sup>C</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam nível de significância de  $P < 0,05$   
n=número de exames realizados; TG=Tubérculo genital.

Pela diferenciação das gônadas fetais, o diagnóstico foi possível em 24 (88,9%) das 27 éguas, valor superior aos 51,9% obtidos pela técnica do tubérculo genital ( $P=0,003$ ) (Tabela 1) e semelhantes aos 88% (300 diagnósticos possíveis em 341 exames) obtidos por Livini (2010) e aos 85% referidos por Holder (2000). Os presentes resultados confirmam o descrito por Carmo et al. (2008), que relataram maior facilidade na sexagem pela avaliação das gônadas fetais. Em estudo conduzido por Resende et al. (2014), 86 éguas foram examinadas entre 90 e 180 dias de gestação e a taxa de diagnósticos possíveis foi de 81,4%, semelhante à obtida no presente trabalho. Segundo os referidos autores, a utilização de equipamentos de ultrassonografia em modo Doppler amplia a eficiência da técnica (98,8% de diagnósticos possíveis), principalmente em gestações avançadas (150 a 180 dias).

A ultrassonografia em modo Doppler evidencia o plexo pampiniforme e a veia testicular (machos) e a vascularização entre as camadas medular e cortical do ovário (fêmeas) (RESENDE et al., 2014). Apesar de facilitar a execução da sexagem fetal, a maioria dos equipamentos de ultrassonografia utilizada na rotina da reprodução não possui modo Doppler, sendo os exames realizados em modo B.

A raça e o tamanho das éguas podem influenciar o sucesso do exame. Animais grandes apresentam o útero gravídico mais profundo e, conseqüentemente, menos acessível pelo exame retal (CARMO et al., 2008). Apesar dos cavalos da raça Crioula não

possuírem grande estatura, encontrou-se maior dificuldade nas éguas mais velhas e pluríparas, pois essas possuíam úteros posicionados mais ventralmente no abdômen. Essa é uma característica comum em éguas pluríparas, devido ao alongamento do mesométrio ocasionado pelo peso dos fetos no decorrer das diversas gestações (BRIN et al., 2010).

A acurácia da sexagem pelas gônadas fetais foi de 83,3% (20/24). Esse valor não diferiu estatisticamente ( $P=0,85$ ) do obtido pela identificação do tubérculo genital (85,7%) (12/14) (Tabela 1), entretanto, na prática notou-se maior facilidade na execução do exame mais tardio. Estudo semelhante foi realizado por Taveiros et al. (2008), no entanto esses pesquisadores tinham como referência, para o diagnóstico entre o 90° e o 150° dias, a identificação do prepúcio, nos machos, e do clitóris e glândula mamária, nas fêmeas. Os autores relataram maior acurácia no exame realizado com base na identificação das estruturas da genitália externa (93,7%) quando comparado ao exame baseado no tubérculo genital (90,1%). Os melhores resultados obtidos pelos pesquisadores, quando comparados aos dados do presente estudo, podem ser justificados pela realização de várias avaliações para cada feto (exames em dias alternados durante todo o período de diagnóstico). No presente experimento foi realizado apenas um exame por técnica em cada feto.

A acurácia da sexagem para fêmeas, pela técnica da diferenciação das gônadas fetais, foi de 94,4% (17 de 18 diagnósticos corretos), valor superior ( $P=0,01$ ) aos 50% obtidos para os machos (3 de 6 diagnósticos corretos) (Tabela 2). Diferentemente do encontrado nos exames pela técnica do tubérculo genital, pela avaliação das gônadas fetais houve maior dificuldade no diagnóstico dos machos. Segundo Livini (2010), os ovários são facilmente reconhecíveis nas fêmeas, porém, nos machos, estruturas como pênis e prepúcio são mais facilmente identificadas do que os testículos. Considerando

que no presente estudo as avaliações foram focadas apenas na avaliação gonadal, o maior sucesso no diagnóstico de fêmeas se justifica.

#### **4.4 Conclusões**

Conclui-se que, em condições de campo, a sexagem fetal pela avaliação das gônadas fetais apresentou-se mais eficiente que a identificação do tubérculo genital, em função da maior taxa de diagnósticos possíveis.

## 4.5 Referências

- BRIN, P.; SCHUMACHER, J.; SCHUMACHER, J. Elevating the uterus (uteropexy) of five mares by laparoscopically imbricating the mesometrium. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 8, p. 675–679, 2010.
- BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 568–571, 2005.
- CARMO, M.T.; OLIVEIRA, J.V.; ALMEIDA, M.T. et al. Avaliação ultra-sonográfica da gônada fetal em equinos: uma nova alternativa para sexagem. **Anais IX Conferência Anual ABRAVEQ**, 2008.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 1989.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 809–814, 1991.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic fetal gender diagnoses during months 5 to 11 in mares. **Theriogenology**, v. 40, p. 1127–1135, 1993.
- CURRAN, S.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Determining Sex of the Bovine Fetus by Ultrasonic Assessment of the Relative Location of the Genital Tubercle. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 217–227, 1989.
- HOLDER, R.D. Fetal sex determination in the mare between 55 and 150 days gestation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 46, p. 321-324, 2000.
- HUBBELL, J. A. E. Sedation and Anesthesia of the Pregnant Mare. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 55–60, 2011.

LIVINI, M. Determination of Fetal Gender by Transrectal Ultrasound Examination : Field ' s Experience. **AAEP Proceedings**, v. 56, p. 323-327, 2010.

MARI, G.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1237–1243, 2002.

MERKT, H.; MOURA, J. C.; JÖCHLE, W. Gender determination in equine fetuses between days 50 and 90 of pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 90–94, 1999.

RENAUDIN, C. D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal Combined with Transrectal Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender During Midgestation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 43, p. 252-255, 1997.

RESENDE, H.L.; CARMO, M.T.; NETO, C.R. et al. Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, p. 756-758, 2014.

TAVEIROS, A.W.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R. et al. Utilização do ultrassom para sexar fetos equinos da raça Mangalarga Marchador pela visualização do tubérculo genital e da genitália. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 4, p. 35-40, 2008.

TURNER, R.M. Fetal Sexing for the Practitioner. **Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium**, p. 119-124, 2013.

## 5 CAPÍTULO III

### **INFLUÊNCIA DO SEXO FETAL SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA EM ÉGUAS ENTRE O 5º E O 8º MÊS DE GESTAÇÃO**

Influence of fetal sex on plasma testosterone concentrations in mares between the 5th and 8th month of gestation

#### **RESUMO**

Os objetivos do estudo foram avaliar a influência do sexo fetal sobre as concentrações plasmáticas de testosterona entre o 5º e o 8º mês de gestação na égua e verificar a aplicabilidade deste exame para a predição do sexo fetal. Amostras de sangue foram coletadas, com intervalos de 30 dias, de 21 éguas da raça Crioula, a partir de 150 dias de gestação até 240 dias. A testosterona plasmática foi determinada por radioimunoensaio e o sexo dos potros foi confirmado ao nascimento. Os valores de testosterona materna foram superiores nas éguas gestando fetos fêmeas aos 5 e 8 meses ( $P < 0,05$ ). Através da análise da curva ROC foram determinados valores limites, sendo 35,5pg/mL para o 5º mês e 40pg/mL para o 8º. Éguas com testosterona plasmática igual ou acima dos valores limites foram preditas como gestando fêmeas e éguas com testosterona plasmática abaixo dos valores limites foram preditas como gestando machos. Aos 5 meses, os valores preditivos para fetos machos e fêmeas foram 70% e 88,9%, respectivamente; as taxas de detecção foram 87,5% e 72,7% e a acurácia total do exame foi de 78,9%. Aos 8 meses, os valores preditivos para fetos machos e fêmeas foram 80% e 90%, respectivamente; as taxas de detecção foram 88,9% e 81,8% e a acurácia total do exame foi de 85%. Conclui-se que o sexo fetal influenciou as concentrações plasmáticas de testosterona em éguas gestantes. A predição do sexo fetal baseada nas concentrações plasmáticas de testosterona materna pode ser realizada aos 5 e 8 meses de gestação com 78,9% e 85% de acurácia, respectivamente.

**Palavras-chave:** sexagem fetal; cavalos; reprodução equina

## **ABSTRACT**

The objectives of the study were to evaluate the influence of fetal sex on plasma concentrations of testosterone between the 5th and 8th month of gestation in the mare and to verify the applicability of this test to the prediction of fetal sex. Blood samples were collected at 30 day intervals from 21 Crioulo mares, from 150 days of gestation up to 240 days. Plasma testosterone was determined by radioimmunoassay and the sex of the foals was confirmed at birth. The values of maternal testosterone were higher in the mares gestating female fetuses at 5 and 8 months ( $P<0.05$ ). Through the analysis of the ROC curve, limit values were determined, being 35.5pg/mL for the 5th month and 40pg/mL for the 8th month. Mares with plasma testosterone equal to or above limit values were predicted as gestating females and mares with plasma testosterone below the limit values were predicted as male gestating. At 5 months, the predictive values for male and female fetuses were 70% and 88.9%, respectively; the detection rates were 87.5% and 72.7%, and the total accuracy of the examination was 78.9%. At 8 months, the predictive values for male and female fetuses were 80% and 90%, respectively; the detection rates were 88.9% and 81.8%, and the total accuracy of the examination was 85%. It was concluded that fetal sex influenced the plasma concentrations of testosterone in pregnant mares. Prediction of fetal sex based on plasma concentrations of maternal testosterone can be performed at 5 and 8 months gestation with 78.9% and 85% accuracy, respectively.

**Key words:** fetal sexing; horses; equine reproduction



## 5.1 Introdução

O diagnóstico pré-natal do sexo fetal (sexagem fetal) é realizado rotineiramente na medicina humana, porém sua aplicação na medicina veterinária ainda é limitada. O interesse pela sexagem varia de acordo com a espécie e raça em questão. Em bovinos de raças leiteiras a preferência é por produtos do sexo feminino, enquanto em raças de corte geralmente prefere-se produtos machos, devido ao maior peso e melhor conversão alimentar (KIBUSHI et al., 2016). Em espécies selvagens mantidas em cativeiro, a sexagem pode ser utilizada como ferramenta de manejo, o qual muitas vezes difere entre fêmeas e machos (DUER et al., 2002).

Em cavalos, o interesse por potros de determinado sexo varia de acordo com a raça, atividade e preferência do proprietário. Enquanto em animais de polo existe a preferência por fêmeas (PASHEN et al., 1993; PANARACE et al., 2014), em cavalos de corrida geralmente prefere-se machos (CHEZUM; WIMMER, 1997). Embora a sexagem seja um exame para o diagnóstico do sexo fetal, e não para a escolha deste, sua realização pode influenciar decisões estratégicas tomadas pelo criador. O planejamento de determinado acasalamento, a introdução ou não de éguas prenhes em leilões, seu valor de mercado ou de seguro podem ser diretamente afetados pelo sexo do produto (MCGLADDERY, 2011; AURICH; SCHNEIDER, 2014).

Atualmente existem duas técnicas para sexagem fetal utilizadas na rotina da reprodução equina. A primeira, baseada na identificação e posição do tubérculo genital do feto, é realizada por ultrassonografia transretal, preferencialmente entre o 59° e 68° dias de gestação (CURRAN; GINTHER, 1989). A segunda técnica é baseada na avaliação das gônadas fetais e genitália externa e pode ser realizada por ultrassonografia transretal (entre o 90° e 150° dias de gestação, aproximadamente) ou transabdominal (até o 220°

dia de gestação, aproximadamente) (RENAUDIN et al., 1997, 1999; BUCCA, 2005; LIVINI, 2010).

Recentemente uma técnica molecular, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi descrita para realização da sexagem fetal nos 3 últimos meses de gestação em equinos. Tal método possui acurácia de 95% e é baseado na detecção de DNA fetal livre circulante no sangue materno. Este exame é menos invasivo que os anteriores, pois requer apenas coleta de sangue da égua, eliminando os riscos inerentes ao exame retal (DE LEON et al., 2012). Entretanto, até o momento, a aplicação a campo deste método de sexagem é limitada, sendo restrita a trabalhos de pesquisa.

Apesar das opções disponíveis para a determinação do sexo fetal em éguas prenhes, este exame ainda é subutilizado na reprodução equina. As técnicas atuais exigem equipamentos de alto custo e/ou experiência do examinador, o que limita sua aplicação. A utilização desta biotecnologia pode ser ampliada caso seja realizada com acurácia, em uma única avaliação e em condições de campo (MARI et al., 2002; BUCCA, 2005; AURICH; SCHNEIDER, 2014).

Alternativas aos métodos convencionais de sexagem fetal já foram descritos em mulheres (MEULENBERG; HOFMAN, 1991), elefantes (DUER et al., 2002) e vacas (KIBUSHI et al., 2016), e baseiam-se nos níveis plasmáticos de testosterona nas fêmeas gestantes. Em estudo realizado por Meulenberg e Hofman (1991), mulheres gestando fetos do sexo masculino apresentaram aumento gradual nas concentrações de testosterona durante a gravidez, já as mulheres gestando fetos do sexo feminino apresentaram níveis decrescentes de testosterona após o primeiro trimestre.

Em elefantes asiáticos, os níveis séricos de testosterona são significativamente maiores em fêmeas gestando fetos machos quando comparadas às gestando fêmeas, a partir do segundo trimestre de prenhez (DUER et al., 2002). Em bovinos também há

influência nos níveis plasmáticos de testosterona de acordo com o sexo do feto, sendo esses superiores nas vacas gestando machos, a partir da segunda metade da gestação (KIBUSHI et al., 2016).

Até o momento não existem estudos relacionando o sexo fetal e as concentrações maternas de testosterona na égua prenhe. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram: avaliar a influência do sexo fetal sobre as concentrações plasmáticas de testosterona entre o 5° e o 8° mês de gestação; e verificar a aplicabilidade deste exame como uma técnica para sexagem fetal pouco invasiva.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Animais**

Foram utilizadas 21 éguas da raça Crioula, com idades entre 4 e 17 anos (média  $8,8 \pm 4,2$  anos), alojadas em uma cabanha situada à latitude  $25^{\circ}32'84''\text{S}$  e longitude  $49^{\circ}87'84''\text{W}$ . As éguas foram cobertas ou inseminadas com 5 diferentes garanhões da raça Crioula após controle folicular, sendo a ovulação detectada por ultrassonografia transretal e sua data anotada. A partir do 5° mês de gestação foram realizadas coletas de sangue mensais, até o 8° mês. As éguas foram contidas em tronco de contenção para equinos para realização das coletas por venopunção jugular, utilizando seringa (10mL) e agulha descartável (40mmx12mm). As amostras foram depositadas em tubos para coleta de sangue contendo EDTA, homogeneizadas e refrigeradas a  $5^{\circ}\text{C}$  durante o transporte.

No laboratório, as amostras coletadas foram mantidas a temperatura ambiente durante 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 5000 rotações por minuto para separação do plasma. As alíquotas de plasma foram acondicionadas em tubos *ependorf* identificados, congeladas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da determinação da testosterona. Cada amostra foi categorizada de acordo com o mês gestacional, da

seguinte forma: 5 meses (dias 144 a 154 – média  $150 \pm 3,4$  dias), 6 meses (dias 179 a 188 – média  $182 \pm 2,7$  dias), 7 meses (dias 209 a 218 – média  $212 \pm 2,7$  dias) e 8 meses (dias 237 a 255 – média  $243 \pm 3,9$  dias), sendo o dia zero (D0) o dia da ovulação.

### **5.2.2 Dosagem de testosterona**

As amostras referentes aos 5, 6, 7 e 8 meses de gestação foram utilizadas para dosagem de testosterona por radioimunoensaio (RIA). Foi utilizado um kit comercial (RIA Testosterone, Beckman Coulter, Diagnostic Systems Laboratories, USA) para determinação de testosterona total no plasma. A sensibilidade do kit utilizado foi de 20pg/mL para testosterona. O coeficiente de variação intra-ensaios foi de 12,8%.

### **5.2.3 Análise estatística**

Os resultados das dosagens foram categorizados de acordo com o mês gestacional e sexo do potro nascido. O teste de Grubb's (*Graphpad software*) foi aplicado a cada categoria para detecção e exclusão dos *outliers*. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a variação nos níveis de testosterona materna de acordo com o sexo fetal e mês de gestação. Para analisar a relação do mês gestacional sobre os níveis de testosterona, realizou-se o pós-teste de Tuckey para mensurações repetidas. Para avaliar a influência do sexo fetal sobre a testosterona sérica materna, aplicou-se o teste T não pareado. Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

Nos meses em que houve diferença estatística nas concentrações de testosterona, de acordo com o sexo fetal, foram estabelecidos valores limites. Estes valores foram determinados utilizando a curva ROC (receiver operating characteristic), elaborada pelo programa estatístico Sigma Plot TM 12.0 (software Systat, San Jose, CA). A partir dos valores limites foram determinados os valores preditivos para fetos fêmeas e machos.

Tais valores preditivos foram calculados dividindo o número de éguas verdadeiramente gestando fetos de determinado sexo pelo número de éguas preditas para este sexo pelas concentrações de testosterona (Figura 1a-b). A taxa de detecção de feto masculino ou feminino foi definida como o número de animais preditos para gestar um feto masculino ou feminino, com base na testosterona materna, pelo número de animais gestando verdadeiramente um feto masculino ou feminino (Figura 2c-d). A acurácia foi definida como o número de animais com gênero fetal corretamente previsto pelo número total de animais (Figura 1e) (KIBUSHI et al., 2016).

(a) Valor preditivo para machos =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de machos nascidos}}{\text{n}^\circ \text{ de éguas preditas como gestando machos pela testosterona plasmática}}$
(b) Valor preditivo para fêmeas =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas nascidas}}{\text{n}^\circ \text{ de éguas preditas como gestando fêmeas pela testosterona plasmática}}$
(c) Taxa de detecção para machos =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de éguas preditas como gestando machos pela testosterona plasmática}}{\text{n}^\circ \text{ de machos nascidos}}$
(d) Taxa de detecção para fêmeas =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de éguas preditas como gestando fêmeas pela testosterona plasmática}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas nascidas}}$
(e) Acurácia =	$\frac{\text{n}^\circ \text{ de animais com o sexo corretamente predito}}{\text{n}^\circ \text{ total de animais}}$

**FIGURA 1** – Equações utilizadas nos cálculos dos valores preditivos, taxas de detecção e acurácia para a predição do sexo fetal em éguas, com base nas concentrações maternas de testosterona plasmática.

#### 5.2.4 Comitê de ética

O experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do setor de ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná (protocolo número 117/2016).

### 5.3 Resultados

Das 21 éguas utilizadas neste estudo, 12 pariram potros do sexo feminino e 9 do sexo masculino. Dos valores de testosterona determinados, 4 dosagens foram excluídas da análise estatística por serem consideradas *outliers* pelo teste de Grubb's. Os valores médios de testosterona materna de acordo com o mês gestacional e sexo do potro nascido estão sumarizados na Tabela 1.

**TABELA 1** – Valores de testosterona plasmática em éguas gestantes, do 5° ao 8° mês de gestação, de acordo com o sexo do feto.

Mês gestacional	Testosterona plasmática (pg/mL) em éguas gestando fetos fêmeas*	Testosterona plasmática (pg/mL) em éguas gestando fetos machos*	Valor de P
5° (n=19)	44 ± 12,7 <sup>a</sup>	31,9 ± 7,6 <sup>bAB</sup>	0,028
6° (n=20)	44,2 ± 20,3 <sup>a</sup>	45,3 ± 14,3 <sup>aA</sup>	>0,05
7° (n=21)	46,5 ± 15,5 <sup>a</sup>	34,2 ± 12,4 <sup>aAB</sup>	>0,05
8° (n=20)	44,8 ± 9,7 <sup>a</sup>	32,4 ± 10 <sup>aB</sup>	0,0013

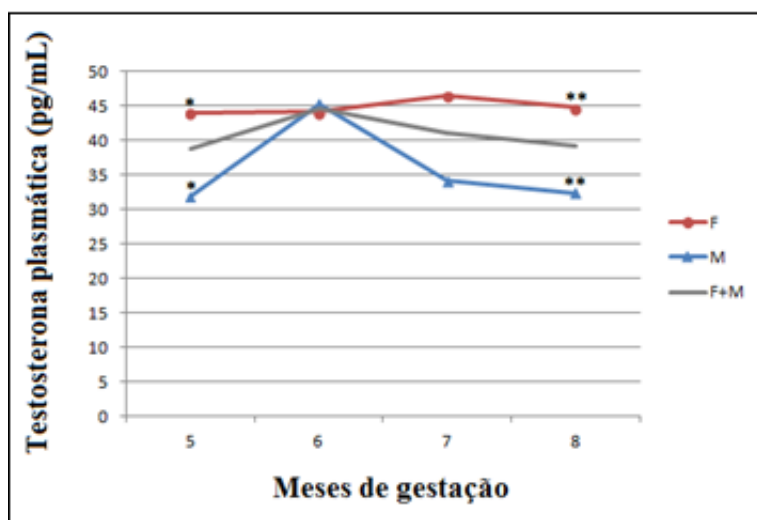
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam nível de significância de  $P < 0,05$

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam nível de significância de  $P < 0,05$

n – número de animais considerados nos cálculos de acordo com o mês gestacional (foram excluídos os valores detectados como *outliers*)

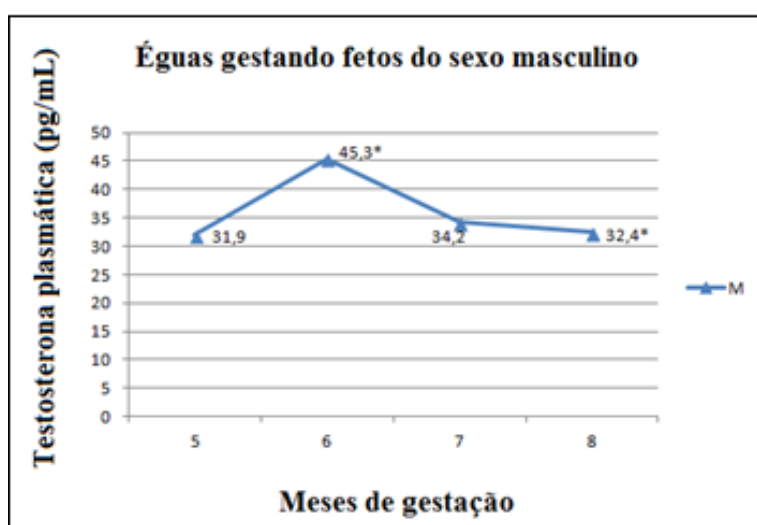
\*Valores de média ± desvio padrão

Houve diferença estatística entre a concentração plasmática de testosterona em éguas prenhes de fetos machos quando comparadas às prenhes de fetos fêmeas durante o 5° e o 8° mês de gestação, sendo valores superiores encontrados nas éguas gestando fetos do sexo feminino (Figura 2). Nas éguas gestando fêmeas, não houve variação nos níveis plasmáticos médios de testosterona com o decorrer dos meses. Nas éguas gestando machos, o valor médio foi significativamente maior no 6° mês, quando comparado ao 8° ( $P < 0,05$ ) (Figura 3).



**FIGURA 2** – Níveis médios de testosterona plasmática em éguas gestando fetos do sexo feminino (F) ou masculino (M) entre o 5º e o 8º mês de gestação.

Os pontos marcados com asterisco indicam os meses em que houve diferença estatística na concentração plasmática materna de testosterona, de acordo com o sexo do feto em gestação. \*P=0,028, \*\*P=0,0013.

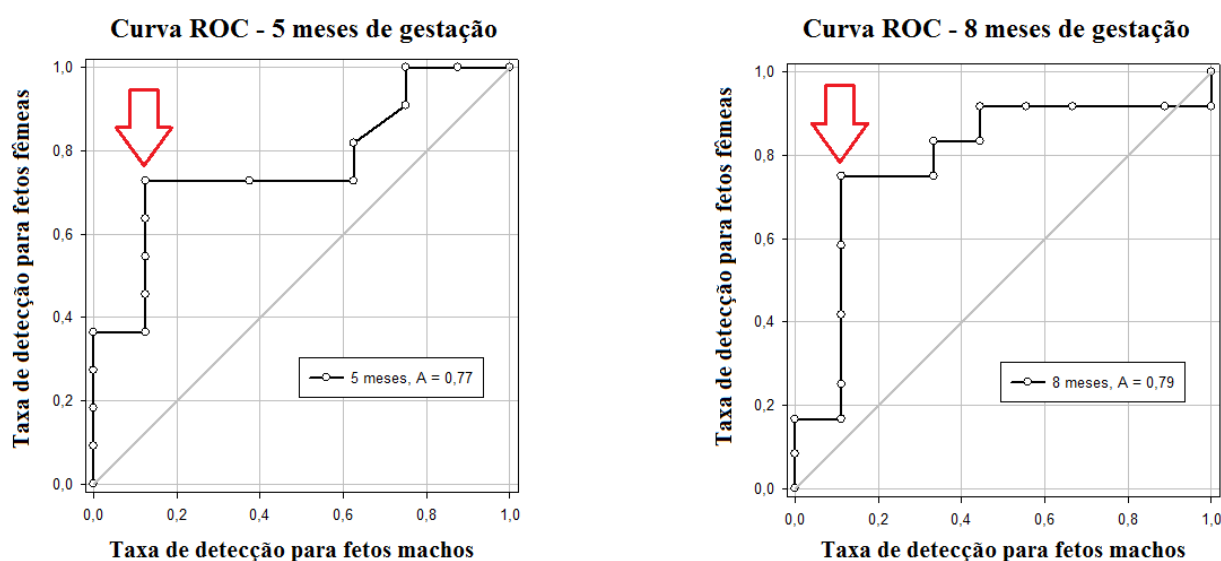


**FIGURA 3** – Níveis médios de testosterona plasmática em éguas gestando fetos do sexo masculino (M) entre o 5º e o 8º mês de gestação.

Os pontos marcados com asterisco indicam os meses em que houve diferença estatística na concentração plasmática materna de testosterona, de acordo com o mês gestacional. \*P<0,05.

Através da análise da curva ROC produzida para o 5º e 8º meses de gestação (Figura 4), os valores limites para as concentrações de testosterona materna utilizadas para predizer o sexo fetal foram estabelecidos. Estes valores foram 35,5pg/mL e

40pg/mL, para 5 e 8 meses de gestação, respectivamente. Éguas apresentando testosterona plasmática igual ou superior aos valores limites eram preditas como gestando fetos fêmeas; éguas com testosterona plasmática abaixo dos valores limites eram preditas como gestando fetos machos. Os valores preditivos para machos e fêmeas, as taxas de detecção e a acurácia da predição do sexo de acordo com a testosterona materna estão descritos nas Tabelas 2 e 3.



**FIGURA 4** – Curvas ROC (receiver operating characteristic) para a determinação dos valores limites para testosterona plasmática aos 5 e 8 meses de gestação na égua. As setas indicam os pontos das curvas ROC que apresentaram maiores taxas de detecção para fetos fêmeas e machos. Pela seleção destes pontos foram estabelecidos os valores de corte para cada mês gestacional.

**TABELA 2** – Cálculos dos valores preditivos, taxas de detecção e acurácia para a predição do sexo fetal de acordo com a concentração materna de testosterona em éguas, aos 5 meses de gestação.

5 meses de gestação (n=19)	n	Machos nascidos	Fêmeas nascidas	Valores preditivos
Éguas preditas como gestando fetos machos Testosterona < 35,5pg/mL	10	7	3	7/10 (70%)
Éguas preditas como gestando fetos fêmeas Testosterona ≥ 35,5pg/mL	9	1	8	8/9 (88,9%)
				<b>Acurácia</b>
Taxas de detecção		7/8 (87,5%)	8/11 (72,7%)	15/19 (78,9%)



**TABELA 3** – Cálculos dos valores preditivos, taxas de detecção e acurácia para a predição do sexo fetal de acordo com a concentração materna de testosterona em éguas, aos 8 meses de gestação.

8 meses de gestação (n=20)	n	Machos nascidos	Fêmeas nascidas	Valores preditivos
Éguas preditas como gestando fetos machos Testosterona < 40pg/mL	10	8	2	8/10 (80%)
Éguas preditas como gestando fetos fêmeas Testosterona ≥ 40pg/mL	10	1	9	9/10 (90%)
<b>Taxas de detecção</b>		8/9 (88,9%)	9/11 (81,8%)	<b>Acurácia</b> 17/20 (85%)

#### 5.4 Discussão

Antes do advento da sexagem fetal por ultrassonografia, estudos relacionando as concentrações de testosterona no líquido amniótico e no sangue materno com o sexo fetal foram realizados em mulheres gestantes. Zondek, et al. (1977) detectaram maiores concentrações de testosterona no líquido amniótico de mulheres gestando fetos do sexo masculino. Glass e Klein (1981) não encontraram diferenças entre as concentrações de testosterona séricas em mulheres, de acordo com o sexo fetal, na primeira metade da gestação. Entretanto Meulenberg e Hofman (1991) realizaram um estudo durante a segunda metade da gestação e encontraram valores de testosterona sérica superiores em mulheres gestando fetos do sexo masculino.

Duer et al. (2002) realizaram um estudo com o intuito de predizer o sexo fetal com base nas concentrações maternas de testosterona em elefantes asiáticos. De acordo com a referida pesquisa, os valores de testosterona materna foram superiores durante o segundo e terceiro trimestres de prenhez nas elefantas gestando fetos machos (DUER et al., 2002). Recentemente, a dosagem plasmática de testosterona materna no decorrer da

gestação foi realizada em vacas e novilhas leiteiras e de corte. Os autores de tal estudo encontraram concentrações de testosterona significativamente maiores nos animais que gestavam fetos machos, tanto para as leiteiras (durante os 4, 5, 7 e 8 meses de prenhez), quanto para as de corte (entre os 4, 5, 6 e 8 meses de prenhez) (KIBUSHI et al., 2016).

Em equinos não existem trabalhos objetivando a predição do sexo fetal de acordo com as concentrações de testosterona materna. Embora nesta espécie a sexagem fetal possa ser realizada por ultrassonografia transretal durante dois principais intervalos diagnósticos (59-68 dias e 90-150 dias), este exame ainda é pouco utilizado na rotina (AURICH; SCHNEIDER, 2014; OLIVEIRA et al., 2014). As limitações variam com a técnica empregada, necessidade de equipamentos de alta qualidade para realização do exame, experiência do médico veterinário e tolerância das éguas ao exame retal (CURRAN; GINTHER, 1989).

O presente estudo avaliou as concentrações plasmáticas de testosterona em éguas prenhes, do 5º ao 8º mês de gestação. A testosterona plasmática não apresentou variação com o decorrer dos meses nas éguas gestando fetos fêmeas, no entanto, nas éguas gestando machos o valor médio foi significativamente maior no 6º mês, quando comparado ao 8º ( $P < 0,05$ ) (Figura 3). Estes dados corroboram os descritos por Silberzahn et al. (1984), que encontraram valores máximos de testosterona em éguas entre 180 e 210 dias de gestação. Segundo tais autores, esta variação nos níveis de testosterona acompanha o desenvolvimento das gônadas fetais que, a partir do segundo mês de gestação, são invadidas progressivamente por tecido intersticial esteroidogênico. Durante o sétimo mês o peso das gônadas fetais é superior ao dos ovários maternos e a partir do oitavo mês este interstício é progressivamente reabsorvido, levando à regressão gonadal acentuada (SILBERZAHN et al., 1984).

As dosagens de testosterona plasmática materna no presente estudo tiveram como resultados valores superiores nas éguas gestando fetos do sexo feminino, aos 5 e 8 meses. Estes dados diferem dos relatados em humanos (MEULENBERG; HOFMAN, 1991), elefantes (DUER et al., 2002) e bovinos (KIBUSHI et al., 2016), no entanto corroboram os achados de Silberzahn et al. (1984), que aos 7 meses de prenhez encontraram valores de testosterona mais altos em éguas gestando fetos fêmeas. Embora no presente experimento só tenham ocorrido diferenças significativas no 5° e 8° meses gestacionais, observou-se que os valores de testosterona tenderam a ser superiores nas éguas gestando fêmeas (Figura 2).

Uma exceção ocorreu no 6° mês, quando a média das éguas gestando machos foi ligeiramente superior ( $P>0,05$ ). Apesar de não terem sido realizadas mensurações nos últimos 3 meses de prenhez, acredita-se que esta tendência se mantenha até o termo, visto que em neonatos a testosterona circulante é superior nas potras (600 a 750 pg/mL, 0 horas após o nascimento; 400 a 500 pg/mL, 48 horas após o nascimento) do que nos potros (500 a 600 pg/mL, 0 horas após o nascimento; 200 a 250 pg/mL, 48 horas após o nascimento) (DHAKAL et al., 2011; NAKAI et al., 2007).

Devido às dificuldades na obtenção de amostras de sangue fetal equino durante a gestação, há poucas informações sobre a endocrinologia fetal nesta espécie, quando comparada a outros animais domésticos (OUSEY, 2011). Ainda não existem explicações concretas que justifiquem as diferenças hormonais encontradas entre os sexos no presente estudo. Uma maior concentração de hormônio luteinizante (LH) nos fetos fêmeas pode representar uma hipótese, uma vez que o LH estimula a síntese de testosterona em machos e fêmeas (BARBERIA et al., 1973; WATSON; HINRICHS, 1988). De acordo com Dhakal et al. (2011) e Nakai et al. (2007), as concentrações circulantes de

LH em neonatos são superiores em potras (1,5 a 2,0 ng/mL) quando comparadas a potros (0,3 a 0,4 ng/mL).

Nas fêmeas, a testosterona pode ser produzida a partir do colesterol pelo córtex adrenal e pelas células tecais do ovário (BEAVER; AMOSS, 1982; WATSON; HINRICHS, 1989), enquanto nos machos este hormônio é produzido pelas células de Leydig nos testículos (JOHNSON; THOMPSON, 1983; EISENHAUER; ROSER, 1995) e também pela adrenal (LINSE, 2011). Durante a diferenciação sexual dos fetos, a ligação da testosterona a receptores presentes em órgãos alvo é necessária para que o fenótipo masculino seja expressado (CHRISTENSEN; MEYERS-WALLEN, 2011). Uma segunda hipótese para explicar os valores superiores de testosterona nas éguas gestando fetos fêmeas advém da suposição de que estes fetos possuam menos receptores para testosterona. Desta forma, a testosterona produzida pode permanecer no sangue fetal, permitindo uma passagem superior deste hormônio para a circulação materna.

No presente experimento, valores significativamente mais altos foram encontrados em éguas gestando fetos fêmeas durante o 5º e o 8º mês de prenhez. Valores limites foram definidos para estes dois períodos através da análise da curva ROC. O valor preditivo para diagnóstico de fetos machos, aos 5 meses de gestação, foi de 70%, o que significa que de 10 éguas diagnosticadas como gestando machos pela dosagem de testosterona (valores inferiores a 35,5pg/mL), 7 realmente estavam gestando machos. O valor preditivo para fêmeas (valores iguais ou superiores a 35,5pg/mL), aos 5 meses de gestação, foi de 88,9% (8/9). A taxa de detecção para machos aos 5 meses foi de 87,5%, o que significa que das 8 éguas que realmente gestavam machos, 7 puderam ser diagnosticadas como tais pela dosagem hormonal. Para fêmeas, a taxa de detecção aos 5 meses foi de 72,7% (8/11). Tais valores levaram a uma acurácia total de 78,9% para

predição do sexo fetal aos 5 meses (15 de 19 fetos diagnosticados corretamente) (Tabela 2).

Aos 8 meses de gestação, os valores preditivos para diagnóstico de fetos machos e fêmeas (valor limite 40pg/mL) foram 80% (8/10) e 88,9% (8/9), respectivamente. As taxas de detecção para machos e fêmeas foram 88,9% (8/9) e 81,8% (9/11), respectivamente. A acurácia total aos 8 meses foi de 85% (17/20) (Tabela 3). Os resultados do presente estudo foram similares aos de Kibushi et al. (2016), que obtiveram valores preditivos para diagnóstico do sexo fetal em vacas (baseado em dosagem de testosterona materna) entre 75% e 88,9%. As taxas de detecção para estes autores foram de 61,5% a 93,8% e acurácia entre 75,8% e 79,3%. Tais valores variaram de acordo com o mês gestacional e raça avaliados.

No presente experimento, a acurácia da predição do sexo fetal baseada na testosterona plasmática materna foi superior aos 8 meses de gestação, quando comparada aos 5 meses. Considerando que a sexagem fetal pelos métodos convencionais é pouco realizada a partir do 5º mês, a dosagem de testosterona plasmática materna pode ser uma alternativa para a predição do sexo fetal em gestações mais avançadas. Apesar de apresentar acurácia inferior aos métodos convencionais, a presente técnica tem como principais vantagens: a baixa invasividade, que minimiza os riscos para a égua e possibilita sua aplicação às éguas de raças pequenas; e a possibilidade de realizar a predição do sexo fetal em um período pouco explorado pelas demais técnicas.

## **5.5 Conclusões**

Conclui-se que o sexo fetal influenciou as concentrações plasmáticas de testosterona em éguas gestantes. A predição do sexo fetal baseada nas concentrações plasmáticas de testosterona materna pode ser realizada aos 5 e 8 meses de gestação com 78,9% e 85% de acurácia, respectivamente.

## 5.6 Referências

- AURICH, C.; SCHNEIDER, J. Sex determination in horses-Current status and future perspectives. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 1–2, p. 34–41, 2014.
- BARBERIA, J. M.; GINER, J.; CORTES-GALLEGOS, V. Diurnal variations of plasma testosterone in men. **Steroids**, v. 22, n. 5, p. 615–626, 1973.
- BEAVER, B. V.; AMOSS, M. S. Aggressive behavior associated with naturally elevated serum testosterone in mares. **Applied Animal Ethology**, v. 8, n. 5, p. 425–428, 1982.
- BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 568–571, 2005.
- CHEZUM, B.; WIMMER, B. Roses or lemons: Adverse selection in the market for thoroughbred yearlings. **The Review of Economics and Statistics**, v. 79, n. 3, p. 521–526, 1997.
- CHRISTENSEN, B. W.; MEYERS-WALLEN, V. N. Sex Determination and Differentiation. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 2211–2221, 2011.
- CURRAN, S. Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 17–21, 1992.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 1989.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 809–814, 1991.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic fetal gender diagnoses during months 5 to 11 in

mares. **Theriogenology**, v. 40, p. 1127–1135, 1993.

DE LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.F.; DELLAGOSTIN, O.A. et al. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 694-698, 2012.

DHAKAL, P.; TSUNODA, N.; NAKAI, R. et al. Post-Natal Dynamic Changes in Circulating Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Immunoreactive Inhibin, Progesterone, Testosterone and Estradiol-17 $\beta$  in Thoroughbred Colts until 6 Months of Age. **Journal of Equine Science**, v. 22, n. 1, p. 9–15, 2011.

DUER, C.; CARDEN, M.; SCHMITT, D. et al. Utility of maternal serum total testosterone analysis for fetal gender determination in asian elephants (*Elephas maximus*). **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 1–2, p. 47–52, 2002.

EISENHAUER, M.; ROSER, F. Effects of Lipoprotein, Equine Luteinizing Hormone, Equine Follicle-Stimulating Hormone, and Equine Prolactin on Equine Testicular Steroidogenesis In Vitro. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 18–27, 1995.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare - basic and applied aspects**. 2nd. ed. Equiservices, 1992.

GLASS, A. R.; KLEIN, T. Changes in maternal serum total and free androgen levels in early pregnancy: Lack of correlation with fetal sex. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 140, n. 6, p. 656–660, 1981.

HOLDER, R. D. Fetal Sex Determination. **Current Therapy in Equine Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 8741, 2003.

JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L. Age-related and season variation in the sertoli cell population, Daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimuulating



hormone, Luteinizing hormone and Testosterone in Stallions. **Biology of reproduction**, v. 29, n. 3, p. 777–789, 1983.

KIBUSHI, M.; KAWATE, N.; KAMINOGO, Y. et al. Fetal gender prediction based on maternal plasma testosterone and insulin-like peptide 3 concentrations at midgestation and late gestation in cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1764–1773, 2016.

LINSE, V. J. Adrenal Steroids. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 1665–1667, 2011.

LIVINI, M. Determination of Fetal Gender by Transrectal Ultrasound Examination : Field ' s Experience. **AAEP Proceedings**, v. 56, p. 323-327, 2010.

MARI, G.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1237–1243, 2002.

MCGLADDERY, A. Equine Fetal Sex Determination. **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, p. 113-115, 2011.

MERKT, H.; MOURA, J. C.; JÖCHLE, W. Gender determination in equine fetuses between days 50 and 90 of pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 90–94, 1999.

MEULENBERG, P. M. M.; HOFMAN, J. A. Maternal testosterone and fetal sex. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 51–54, 1991.

NAKAI, R.; WENG, Q.; TANAKA, Y. et al. Change in circulating follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, immunoreactive inhibin, progesterone, testosterone and estradiol-17 $\beta$  in fillies from birth to 6 months of age. **Journal of Equine Science**, v. 18, n. 3, p. 85–91, 2007.

OLIVEIRA, R. A.; YAMIM, R.S.; PIVATO, I. et al. Sexagem fetal em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 37–42, 2014.

OUSEY, J. C. Endocrinology of Pregnancy. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 2222–2233, 2011.

PANARACE, M.; PELLEGRINI, R.O., BASUALDO, M.O. et al. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 520–525, 2014.

PASHEN, R. L.; LASCOMBES, F. A.; DARROW, M. D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 119–121, 1993.

RENAUDIN, C.D. Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender. In: BALL, B.A. **Recent Advances in Equine Reproduction**, International Veterinary Information Service, 2000.

RENAUDIN, C.D.; GILLIS, C.L.; TARANTAL, A.F.; Transabdominal Combined with Transrectal Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender During Midgestation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 43, p. 252-255, 1997.

RENAUDIN, C. D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 6, p. 483–487, 1999.

SILBERZAHN, P.; ZWAIN, I.; MARTIN, B. Concentration increase of unbound testosterone in plasma of the mare throughout pregnancy. **Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 416–419, 1984.

TAVEIROS, A. W.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R. et al. Utilização do ultrassom para sexar fetos equinos da raça Mangalarga Marchador pela visualização do

tubérculo genital e da genitália. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 4, p. 35–40, 2008.

WATSON, E. D.; HINRICHS, K. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mare after administration of hCG. **Journal of reproduction and fertility**, v. 84, n. 2, p. 557–61, 1988.

WATSON, E. D.; HINRICHS, K. Adrenal production of sex steroids in the mare. **Theriogenology**, v. 32, n. 6, p. 913–919, 1989.

ZONDEK, T.; MANSFIELD, M. D.; ZONDEK, L. H. Amniotic fluid testosterone and fetal sex determination in the first half of pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 84, p. 714–716, 1977.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização da sexagem fetal na reprodução equina apresenta grande potencial de ampliação, uma vez que atualmente é subutilizada. O maior conhecimento dos criadores, em relação às técnicas disponíveis e suas aplicações, pode levar a um incremento na demanda. A necessidade de experiência por parte dos médicos veterinários é um fator limitante, desta forma, a capacitação e treinamento dos profissionais são essenciais para a obtenção de resultados confiáveis.

No presente estudo, conduzido em condições de campo, a sexagem fetal foi mais eficaz quando realizada pela técnica da avaliação das gônadas fetais, quando comparada à técnica da identificação do tubérculo genital. Embora a acurácia obtida pelas duas técnicas não tenha diferido, a principal vantagem do exame baseado nas gônadas foi a maior taxa de diagnósticos possíveis. Além disso, essa abordagem apresenta um intervalo para realização do diagnóstico mais amplo.

De acordo com os resultados do experimento do capítulo III, a testosterona plasmática em éguas gestando fetos do sexo feminino apresentou valores superiores, aos 5 e 8 meses. A predição do sexo fetal com base na dosagem deste hormônio pode ser realizada com até 85% de acurácia. Considerando que a sexagem fetal pelos métodos convencionais é pouco realizada a partir do 5º mês, a dosagem de testosterona plasmática materna pode ser uma alternativa para a predição do sexo fetal em gestações avançadas.

Apesar de apresentar acurácia inferior aos métodos convencionais, a predição baseada nas concentrações maternas de testosterona tem como principais vantagens: a baixa invasividade, que minimiza os riscos para a égua e possibilita sua aplicação às raças pequenas; e a possibilidade de realizar a predição do sexo fetal em um período pouco explorado pelas demais técnicas.

A partir dos resultados da presente dissertação, sugere-se que mais estudos sejam realizados para elucidar as causas das diferenças na testosterona materna de acordo com o sexo fetal. Além disso, sugere-se que a dosagem de testosterona plasmática seja realizada nos demais meses gestacionais. Considerando que já existem estudos correlacionando valores de progesterona plasmática materna e sexo fetal, sugere-se também que essa correlação seja realizada em éguas gestantes. Acredita-se que o desenvolvimento de técnicas mais simples e acessíveis que as abordagens tradicionalmente empregadas para a sexagem fetal possa ampliar sua aplicação a campo.

## 7 REFERÊNCIAS

- AURICH, C.; SCHNEIDER, J. Sex determination in horses-Current status and future perspectives. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 1–2, p. 34–41, 2014.
- BARBERIA, J. M.; GINER, J.; CORTES-GALLEGOS, V. Diurnal variations of plasma testosterone in men. **Steroids**, v. 22, n. 5, p. 615–626, 1973.
- BEAVER, B. V.; AMOSS, M. S. Aggressive behavior associated with naturally elevated serum testosterone in mares. **Applied Animal Ethology**, v. 8, n. 5, p. 425–428, 1982.
- BRIN, P.; SCHUMACHER, J.; SCHUMACHER, J. Elevating the uterus (uteropexy) of five mares by laparoscopically imbricating the mesometrium. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 8, p. 675–679, 2010.
- BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 568–571, 2005.
- CARMO, M.T.; OLIVEIRA, J.V.; ALMEIDA, M.T. et al. Avaliação ultra-sonográfica da gônada fetal em equinos: uma nova alternativa para sexagem. **Anais IX Conferência Anual ABRAVEQ**, 2008.
- CHEZUM, B.; WIMMER, B. Roses or lemons: Adverse selection in the market for thoroughbred yearlings. **The Review of Economics and Statistics**, v. 79, n. 3, p. 521–526, 1997.
- CHRISTENSEN, B. W.; MEYERS-WALLEN, V. N. Sex Determination and Differentiation. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 2211–2221, 2011.
- CURRAN, S. Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 17–21, 1992.
- CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the

genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 1989.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 809–814, 1991.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic fetal gender diagnoses during months 5 to 11 in mares. **Theriogenology**, v. 40, p. 1127–1135, 1993.

CURRAN, S.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Determining Sex of the Bovine Fetus by Ultrasonic Assessment of the Relative Location of the Genital Tubercle. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 217–227, 1989.

DE LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.F.; DELLAGOSTIN, O.A. et al. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 694-698, 2012.

DHAKAL, P.; TSUNODA, N.; NAKAI, R. et al. Post-Natal Dynamic Changes in Circulating Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Immunoreactive Inhibin, Progesterone, Testosterone and Estradiol-17 $\beta$  in Thoroughbred Colts until 6 Months of Age. **Journal of Equine Science**, v. 22, n. 1, p. 9–15, 2011.

DUER, C.; CARDEN, M.; SCHMITT, D. et al. Utility of maternal serum total testosterone analysis for fetal gender determination in asian elephants (*Elephas maximus*). **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 1–2, p. 47–52, 2002.

EISENHAUER, M.; ROSER, F. Effects of Lipoprotein, Equine Luteinizing Hormone, Equine Follicle-Stimulating Hormone, and Equine Prolactin on Equine Testicular Steroidogenesis In Vitro. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 18–27, 1995.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare - basic and applied aspects**. 2nd. ed. Equiservices, 1992.

GLASS, A. R.; KLEIN, T. Changes in maternal serum total and free androgen levels in

early pregnancy: Lack of correlation with fetal sex. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 140, n. 6, p. 656–660, 1981.

HOLDER, R. D. Fetal sex determination in the mare between 55 and 150 days gestation. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 46, p. 321-324, 2000.

HOLDER, R. D. Fetal Sex Determination. **Current Therapy in Equine Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 8741, 2003.

HUBBELL, J. A. E. Sedation and Anesthesia of the Pregnant Mare. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 55–60, 2011.

JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L. Age-related and season variation in the sertoli cell population, Daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, Luteinizing hormone and Testosterone in Stallions. **Biology of reproduction**, v. 29, n. 3, p. 777–789, 1983.

KIBUSHI, M.; KAWATE, N.; KAMINOGO, Y. et al. Fetal gender prediction based on maternal plasma testosterone and insulin-like peptide 3 concentrations at midgestation and late gestation in cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1764–1773, 2016.

KOTOYORI, Y.; YOKOO, N.; ITO, K. et al. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1480–1486, 2012.

LINSE, V. J. Adrenal Steroids. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 1665–1667, 2011.

LIVINI, M. Determination of Fetal Gender by Transrectal Ultrasound Examination : Field ' s Experience. **AAEP Proceedings**, v. 56, p. 323-327, 2010.

MARI, G.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZZI, S. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1237–1243,



2002.

MCGLADDERY, A. Equine Fetal Sex Determination. **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, p. 113-115, 2011.

MERKT, H.; MOURA, J. C.; JÖCHLE, W. Gender determination in equine fetuses between days 50 and 90 of pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 90–94, 1999.

MEULENBERG, P. M. M.; HOFMAN, J. A. Maternal testosterone and fetal sex. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 51–54, 1991.

NAKAI, R.; WENG, Q.; TANAKA, Y. et al. Change in circulating follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, immunoreactive inhibin, progesterone, testosterone and estradiol-17 $\beta$  in fillies from birth to 6 months of age. **Journal of Equine Science**, v. 18, n. 3, p. 85–91, 2007.

OLIVEIRA, R.A.; YAMIM, R.S.; PIVATO, I. et al. Sexagem fetal em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 37–42, 2014.

OUSEY, J. C. Endocrinology of Pregnancy. In: MCKINNON, A. O. et al., editors. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 2222–2233, 2011.

PANARACE, M.; PELLEGRINI, R.O., BASUALDO, M.O. et al. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 520–525, 2014.

PASHEN, R. L.; LASCOMBES, F. A.; DARROW, M. D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 119–121, 1993.

RENAUDIN, C. D. Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender. In: BALL, B.A. **Recent Advances in Equine Reproduction**, International Veterinary Information Service, 2000.

RENAUDIN, C. D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal Combined with Transrectal Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender During Midgestation.

**Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 43, p. 252-255, 1997.

RENAUDIN, C. D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 6, p. 483–487, 1999.

RESENDE, H.L.; CARMO, M.T.; NETO, C.R. et al. Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. **Equine veterinary journal**, v. 46, p. 756–758, 2014.

TAVEIROS, A.W.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R. et al. Utilização do ultrassom para sexar fetos equinos da raça Mangalarga Marchador pela visualização do tubérculo genital e da genitália. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 4, p. 35–40, 2008.

TURNER, R. M. Fetal Sexing for the Practitioner. **Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium**, p. 119-124, 2013.

SILBERZAHN, P.; ZWAIN, I.; MARTIN, B. Concentration increase of unbound testosterone in plasma of the mare throughout pregnancy. **Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 416–419, 1984.

WATSON, E. D.; HINRICHS, K. Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of the mare after administration of hCG. **Journal of reproduction and fertility**, v. 84, n. 2, p. 557–61, 1988.

WATSON, E. D.; HINRICHS, K. Adrenal production of sex steroids in the mare. **Theriogenology**, v. 32, n. 6, p. 913–919, 1989.

ZONDEK, T.; MANSFIELD, M. D.; ZONDEK, L. H. Amniotic fluid testosterone and fetal sex determination in the first half of pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 84, p. 714–716, 1977.

## ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 117/2016, referente ao projeto “Influência do sexo fetal sobre as concentrações séricas maternas de progesterona e testosterona na espécie equina”, sob a responsabilidade de Romildo Romualdo Weiss – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 03/11/2016.


Vigência do projeto	Janeiro/2017 até Março/2018
Espécie/Linhagem	<i>Equus caballus</i> (equídeo) / Crioula
Número de animais	50
Peso/Idade	450 kg / 4 a 20 anos
Sexo	Fêmea
Origem	Fazenda em São Luiz do Purunã – PR

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 117/2016, regarding the project “Fetal sex influence on maternal serum progesterone and testosterone in the mare”, under Romildo Romualdo Weiss supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 03/11/2016.

Duration of the project	January/2017 until March/2018
Specie/Line	<i>Equus caballus</i> (equine) / Creole
Number of animals	50
Wheight/Age	450 kg / 4 to 20 years
Sex	Female
Origin	Farm in São Luiz do Purunã – PR

Curitiba, 3 de novembro de 2016.

  
 Simone Tostes de Oliveira Stedile  
 Coordenadora CEUA-SCA